



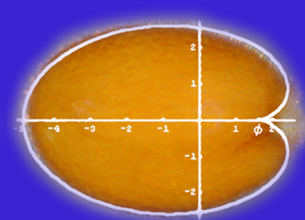
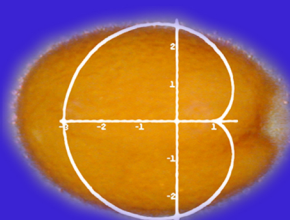
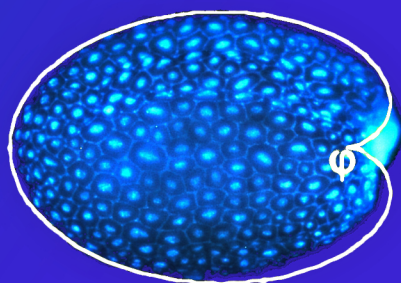
VNiVERSiDAD  
DSALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

FACULTAD DE BiOLOGÍA

*Departamento de  
BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA*

# *Análisis morfológico de las semillas mediante modelos basados en la curva cardioide*



TESIS DOCTORAL  
JOSÉ JAVIER MARTÍN GÓMEZ

2013



CSIC  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BiOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,  
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA



ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS SEMILLAS  
MEDIANTE MODELOS BASADOS EN LA CURVA  
CARDIOIDE



JOSÉ JAVIER MARTÍN GÓMEZ

TESIS DOCTORAL

2013





LOS Dres. JUANA GUTIÉRREZ DE DIEGO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, ÁNGEL TOCINO GARCÍA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MATEMÁTICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EMILIO CERVANTES RUIZ DE LA TORRE, CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DEL CSIC EN SALAMANCA (IRNASA-CSIC),

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada **“Análisis morfológico de las semillas mediante modelos basados en la curva cardioide”** presentada por D. JOSÉ JAVIER MARTÍN GÓMEZ, Licenciado en Biología, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Desarrollo Sostenible de Sistemas Agroforestales y Ganaderos del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC en Salamanca (IRNASA-CSIC), y cumple las condiciones para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a los efectos legales, firman el correspondiente certificado en Salamanca a de Mayo de 2013.

Fdo. Dr. Emilio Cervantes Ruiz de la Torre

Fdo. Dra. Juana Gutiérrez de Diego

Fdo. Dr. Ángel Tocino García





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

La Dra. BELÉN FERNÁNDEZ SANTOS, PROFESORA PROFESORA TITULAR DE ECOLOGÍA EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada **“Análisis morfológico de las semillas mediante modelos basados en la curva cardioide”** presentada por Don JOSÉ JAVIER MARTÍN GÓMEZ para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. EMILIO CERVANTES RUIZ DE LA TORRE, de la Dra. JUANA GUTIÉRREZ DE DIEGO y del Dr. ÁNGEL TOCINO GARCÍA en el Departamento de Desarrollo Sostenible de Sistemas Agroforestales y Ganaderos del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC en Salamanca (IRNASA-CSIC), y estima como tutora que el mencionado trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como tesis doctoral.

Y para que así conste, a los efectos legales, firma y sella el correspondiente certificado en Salamanca a    de Mayo de 2013.

Fdo. Dra. Belén Fernández Santos



*A Celia por su amor.*

*A mis padres por su generosidad.*



Gracias a los directores de esta tesis los Dres. D. Emilio Cervantes, D<sup>a</sup>. Juana Gutiérrez y D. Ángel Tocino, por asumir este proyecto, por su interés, dedicación y su espíritu crítico y perfeccionista.

También quiero agradecer a la Dra. D<sup>a</sup> Belén Fernández por sus valiosas aportaciones, su orientación en Ecología y su buena disposición para facilitarme los trámites con la Universidad.

Al Dr. D. Juan Arellano por todo lo que he aprendido con él durante estos años y por su apoyo a la hora de elaborar esta tesis.

A los Dres. D<sup>a</sup> Samantha Vernhettes y D. Philippe Grappin investigadores del INRA de Versailles, al Dr D. Ezzeddinne Saadaoui investigador del INRGREF Universidad de Carthage y al Dr. D. Peter Gresshoff de la Universidad de Queensland, Australia. Por la donación de las distintas semillas utilizadas en este trabajo.

Gracias a todos los compañeros del IRNASA, también para los que ya no trabajan con nosotros, por su compañerismo y su amistad ya que de un modo u otro han respaldado este proyecto.





## ÍNDICE

---



INTRODUCCIÓN.....	5
1. Tamaño y forma .....	7
1.1. Definiciones .....	9
1.2. Relaciones numéricas: la proporción áurea, el número $\phi$ y la sucesión de Fibonacci 10	
1.3. Magnitudes .....	15
1.3.1. Magnitudes en Biología y en Morfología .....	17
1.3.2. Relaciones geométricas .....	18
2. Morfología.....	23
2.1. Morfología: revisión histórica.....	25
2.2. La Morfología en Botánica .....	27
2.3. Interpretación geométrica de las formas .....	33
3. Especies modelo .....	35
3.1. Modelos .....	37
3.2. Plantas modelo: definición y características .....	38
3.3. Modos de reproducción en las plantas.....	40
3.4. Adaptaciones ecológicas en las plantas .....	41
4. Descripción morfológica de las semillas .....	45
4.1. Semillas: definición, formación y estructura .....	47
4.2. Clasificaciones de las semillas .....	49
4.2.1. Clasificación de Corner .....	49
4.2.2. Clasificación de Martin .....	51
4.2.3. Otras clasificaciones.....	56
4.3. Variaciones en forma y tamaño en las semillas: Interpretación de las clasificaciones anteriores.....	57
4.3.1. Variación en el tamaño de las semillas .....	57
4.3.2. Variación en la forma de las semillas .....	60
4.4. Modelos geométricos para el análisis de la forma de semillas .....	60
OBJETIVOS.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
1. Material vegetal .....	69
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	69
1.2. <i>Capparis spinosa</i> .....	72
1.3. <i>Lotus japonicus</i> .....	74
1.4. <i>Medicago truncatula</i> .....	76
2. Medio y condiciones de cultivo.....	78
3. Fotografía y análisis de las imágenes .....	79
4. Análisis matemático.....	82
4.1. Índice de Circularidad.....	82

4.2	Índice G .....	82
4.3	Índice J .....	83
5.	Análisis estadístico .....	84
5.1.	Análisis descriptivo .....	84
5.2.	Análisis estadístico .....	84
RESULTADOS.....		87
1.	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	89
1.1	La curva cardioide modificada mediante un cambio en la escala por un factor igual a la proporción áurea es un modelo para la forma de las semillas de <i>Arabidopsis</i> .....	91
1.2	Aplicación del modelo a variedades y mutantes en la ruta del etileno .....	92
1.2.1	Experimento 1 .....	92
1.2.2	Experimento 2 .....	98
1.2.3	Experimento 3 .....	99
1.3	Variación de la forma durante la imbibición .....	103
1.3.1	Área .....	104
1.3.2	Índice de Circularidad.....	105
1.3.3	Relación Largo Ancho .....	107
1.3.4	Índice J .....	109
2.	Leguminosas modelo <i>Lotus japonicus</i> y <i>Medicago truncatula</i> .....	113
2.1	Modelo basado en una curva cardioide .....	115
2.2	Comparación entre variedades y mutantes de <i>Lotus japonicus</i> .....	116
2.2.1	Comparación entre variedades .....	117
2.2.2	Comparación entre cada variedad y sus genotipos mutantes .....	118
2.2.3	Comparación entre las semillas secas y embebidas .....	121
2.3	Comparación entre variedades y mutantes de <i>Medicago</i> .....	122
2.3.1	Comparación de la variedad A17 de <i>M. truncatula</i> con su mutante <i>sickle</i> . ....	122
2.3.2	Comparación entre las semillas secas y embebidas .....	123
3.	<i>Capparis spinosa</i> .....	125
3.1.	Modelo basado en la curva cardioide.....	127
3.2.	Tamaño de las semillas.....	129
3.3.	Forma de las semillas.....	130
DISCUSIÓN .....		139
1.	Necesidad de una descripción morfológica de las semillas basada en la Geometría ..	141
2.	Descripción morfológica de las semillas mediante la curva cardioide en plantas-modelo: <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Lotus japonicus</i> , <i>Medicago truncatula</i> . ....	145
3.	Aplicaciones del método basado en la curva cardioide en sistemas modelo: I. Análisis cuantitativo de la forma en variedades y mutantes: <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Lotus japonicus</i> y <i>Medicago truncatula</i> . ....	148
3.1.	Comparación entre variedades. ....	148

3.2. Mutantes en la ruta del etileno en <i>Arabidopsis</i> .....	149
3.3. Mutantes en la ruta del etileno en leguminosas-modelo.....	151
4. Aplicaciones del método basado en la curva cardiode en sistemas modelo: II. Obtención de ecuaciones que representan cambios en la forma durante la germinación de semillas de <i>Arabidopsis</i> .....	154
5. Aplicaciones del método basado en la curva cardiode al análisis morfológico en semillas de dos variedades de <i>Capparis spinosa</i> . ....	157
CONCLUSIONES .....	161
BIBLIOGRAFÍA .....	165
PROCEDENCIA DE LAS IMÁGENES.....	175



## INTRODUCCIÓN

---





## 1. Tamaño y forma



## 1.1. Definiciones

**Área.-** Superficie comprendida dentro de un perímetro.

**Forma.-** Configuración externa de algo. Dos objetos pueden tener la misma forma y distinto tamaño.

**Fruto.-** Producto del desarrollo del ovario de una flor después de la fecundación. En él quedan contenidas las semillas. Con frecuencia cooperan a la formación del fruto tanto el cáliz como el receptáculo floral y otros órganos.

**Magnitud.-** Propiedad física que puede medirse como la longitud, la temperatura, el peso, etc...

**Morfología.-** Parte de la biología que trata de la forma de los seres orgánicos y de las modificaciones o transformaciones que experimentan.

**Número  $\varphi$ .-** Se trata del número irracional

$$\varphi = \frac{1 + \sqrt{5}}{2} ;$$

su representación decimal es, por tanto, aperiódica. Su valor aproximado es 1,618033988749894 .

**Número  $\pi$ .-** Razón de la longitud de la circunferencia con su diámetro.

**Parámetro.-** Dato o factor que se toma como necesario para analizar o valorar una situación. En Matemáticas.- Variable que, en una familia de elementos, sirve para identificar cada uno de ellos mediante su valor numérico.

**Perímetro.-** Contorno de una figura. Medida de ese contorno.

**Proporción.-** Relación comparativa que se establece entre las partes de las cosas en relación con el tamaño o la cantidad.

**Proporción áurea.-** Proporción de valor igual a  $\varphi$ .

**Semilla.-** Óvulo maduro fertilizado.

**Sucesión.-** Conjunto ordenado de términos, uno por cada número natural.

**Superficie.-** Magnitud que expresa la extensión de un cuerpo en dos dimensiones, largo y ancho. Su unidad en el Sistema Internacional es el *metro cuadrado* ( $m^2$ ).

**Tamaño.-** Mayor o menor volumen o dimensión de algo.

**Topología.-** Rama de las Matemáticas que trata especialmente de la continuidad y de otros conceptos más generales originados de ella, como las propiedades de las figuras con independencia de su tamaño o forma.

**Volumen.-** Magnitud física que expresa la extensión de un cuerpo en tres dimensiones: largo, ancho y alto. Su unidad en el Sistema Internacional es el *metro cúbico* ( $m^3$ ). En Geometría el volumen es el espacio ocupado por un cuerpo.

## 1.2. Relaciones numéricas: la proporción áurea, el número $\varphi$ y la sucesión de Fibonacci

La razón áurea fue definida por Euclides de Alejandría, fundador de la Geometría como sistema deductivo formal alrededor del año 300 a.C. Haciendo uso de la Geometría, introdujo la razón áurea como determinada proporción entre dos segmentos de una recta:

"Se dice que un segmento está dividido en media y extrema razón cuando el segmento total es a la parte mayor como la parte mayor es a la menor" (figura 1):

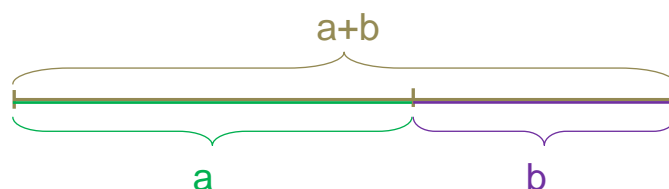


Figura 1.- Segmento dividido en media y extrema razón.

es decir

$$\frac{a+b}{a} = \frac{a}{b}$$

Si se cumple esta relación se dice que la línea ha sido cortada en media y extrema razón. Esta proporción se conoce también como Proporción Divina, Proporción de Oro (*Golden Ratio*). Su valor exacto, representado por  $\varphi$ , es el número irracional

$$\varphi = \frac{1 + \sqrt{5}}{2} = 1,618033988749894 \dots$$

En la literatura matemática antigua, el símbolo común para esta proporción fue la letra griega tau (T) que significa el corte o la sección. A principios del siglo XX fue el matemático estadounidense Mark Barr el que le dio el nombre de  $\varphi$  en honor a Fidias, escultor griego que aplicó esta proporción en sus obras (el partenón de Atenas, el Zeus del templo de Olimpia y otras esculturas; Livio, 2011). En Geometría hay varias formas que están relacionadas con la proporción áurea (figura 2):

- El rectángulo áureo.- Es aquel en el que la proporción del lado más largo ( $a+b$ ) con el más corto ( $a$ ) es igual al número  $\varphi$ . Si de este rectángulo substraemos un cuadrado cuyos lados sean iguales al lado menor ( $a$ ) la figura resultante es otro rectángulo áureo.
- El triángulo áureo es aquel en el que la proporción de su lado más largo con relación al más corto es igual a la proporción áurea. Se obtiene al trazar en un pentágono regular dos diagonales adyacentes. En el triángulo central dos de sus ángulos son de  $72^\circ$  y el otro es de  $36^\circ$ . A partir de éste se obtienen triángulos áureos mediante sucesivas divisiones manteniendo esta proporción.
- En el pentágono regular la proporción de la diagonal al lado es igual al número  $\varphi$ .

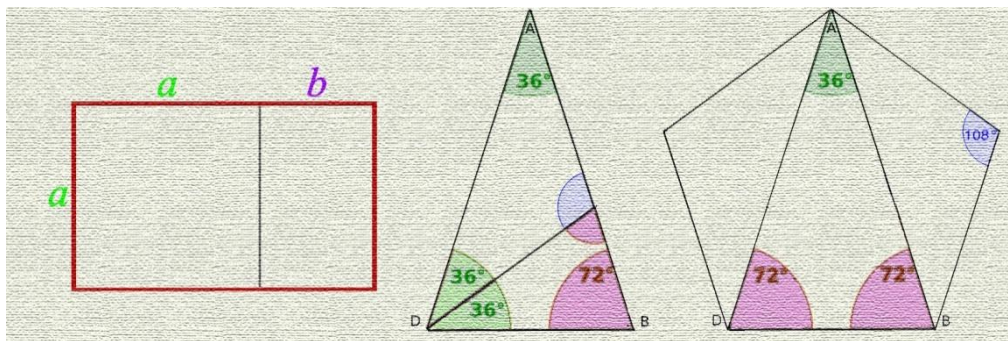


Figura 2.- Figuras geométricas que tienen relación con la proporción áurea.

- Ángulo áureo es el ángulo conjugado del que resulta del cociente de un giro completo entre la proporción áurea ( $\alpha = 360 - 360/\varphi = 137,5$ ) grados. Este valor coincide con el del ángulo que se forma entre los dos extremos del segmento más corto (de un segmento áureo) si con el segmento total formamos una circunferencia (figura 3).

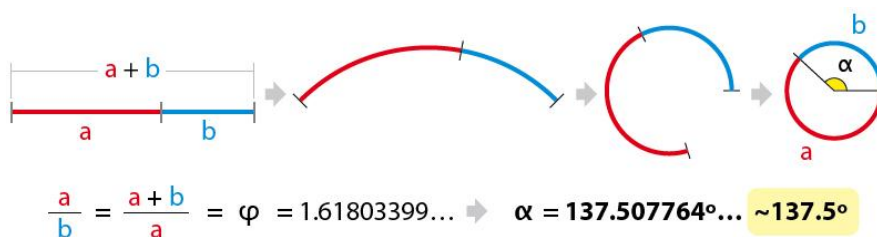


Figura 3.- Ángulo áureo obtenido a partir de un segmento áureo.

El matemático alemán G. van Iterson en 1907 demostró que en un conjunto de elementos separados por  $137,5^\circ$ , el ojo distinguirá una familia de espirales enrolladas en el sentido de las agujas del reloj y otra familia enrollada en el sentido opuesto (Livio, 2011); esta disposición es la que podemos ver en las flores del girasol o en las escamas de las piñas (figura 4).

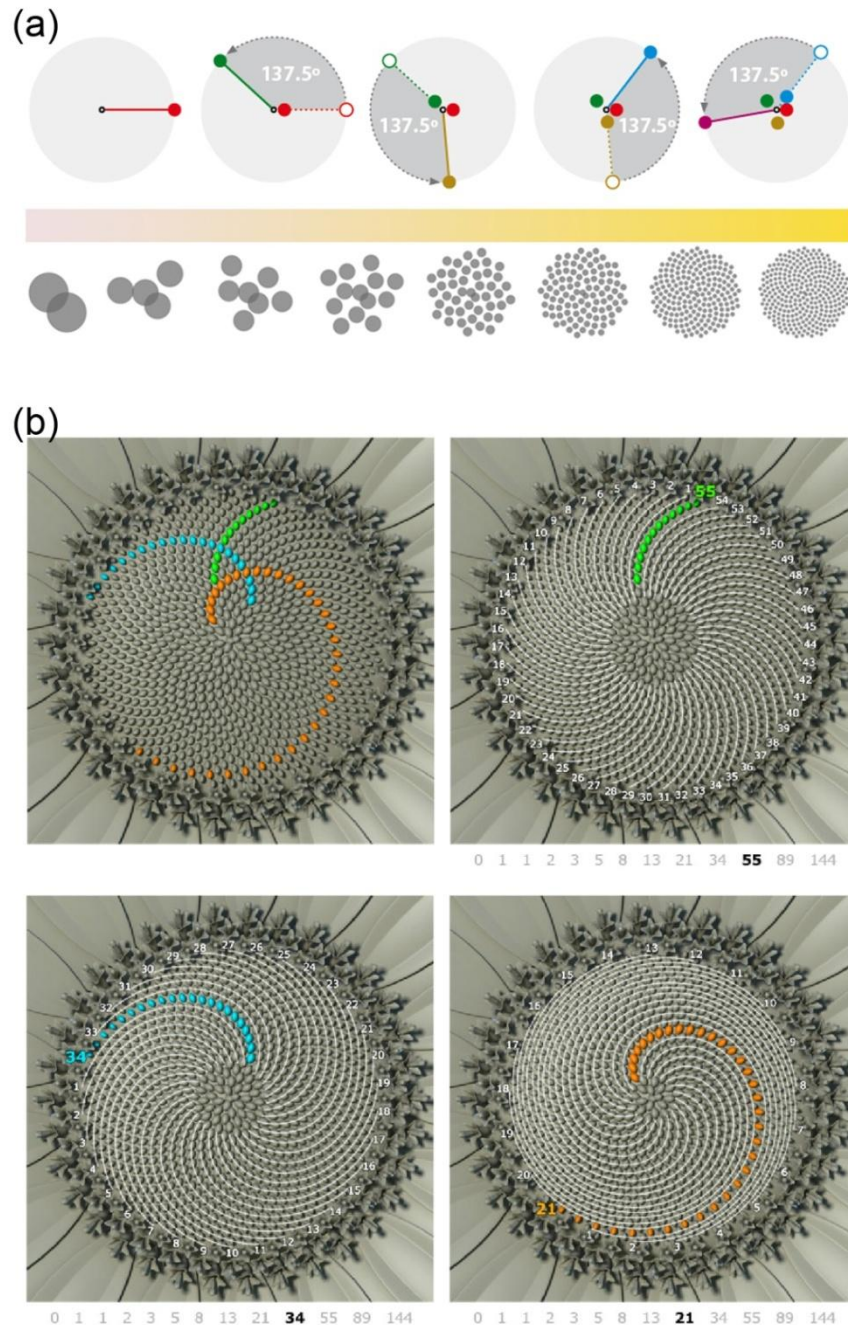


Figura 4.- Disposición de elementos separados por un ángulo de  $137,5^\circ$ . (a) Según vamos añadiendo elementos se va formando la espiral. (b) Disposición de las semillas en un girasol.

- La espiral logarítmica o equiangular (el nombre proviene de la forma en que el radio cambia a medida que nos movemos alrededor de la curva) tiene una propiedad fundamental única y es que su forma no se altera cuando aumenta su tamaño. Ésta espiral y la proporción áurea están relacionadas pues se puede construir una espiral logarítmica a partir de rectángulos o triángulos áureos anidados (figura 5).

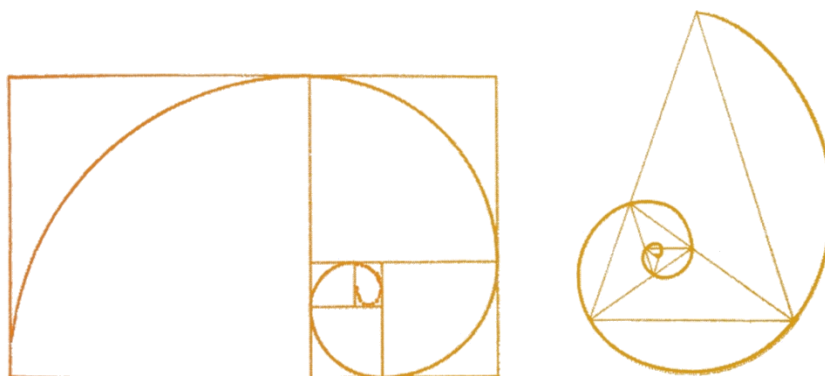


Figura 5.- Espiral equiangular construida a partir de rectángulos y triángulos áureos.

En las Bellas Artes a lo largo de la historia, la proporción áurea aparece expresada a menudo, tanto en Arquitectura (como ya se ha mencionado) como en Escultura y en Pintura (La Gioconda de Leonardo da Vinci o el Sacramento de la Última Cena de Salvador Dalí entre otros).

En la naturaleza podemos encontrar numerosos ejemplos en los que está presente la proporción áurea. La espiral equiangular se encuentra representada en muchos organismos: la concha del *Nautilus* (quizás el más conocido), los cuernos de los carneros, la curva de los colmillos de los elefantes, la disposición de las flores en el capítulo de los girasoles y otras asteráceas o la disposición de las escamas de las piñas (figura 6).

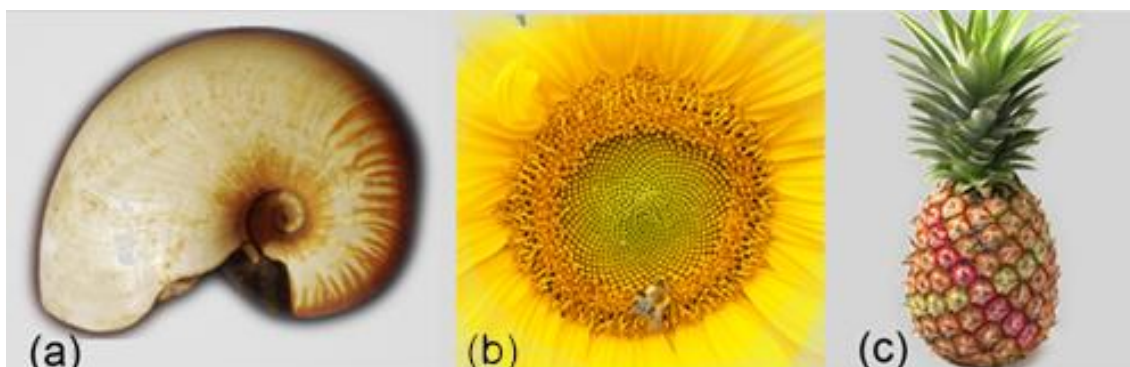


Figura 6.- Ejemplos de espirales logarítmicas en la naturaleza. (a) *Allonautilus scrobiculatus*, (b) *Helianthus annuus* y (c) *Annanas comosus*.



## La sucesión de Fibonacci

Esta sucesión fue descrita por Leonardo de Pisa, también llamado Fibonacci, matemático italiano del siglo XIII; está compuesta por números enteros y cada elemento se obtiene sumando los dos anteriores, siendo los dos primeros números de la serie el uno.

1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21, 34, 55, 89, 144.....

Cualquier elemento ( $F_n$ ) de la sucesión se puede calcular con la siguiente relación:

$$F_n = F_{n-1} + F_{n-2}$$

Numerosas relaciones numéricas encontradas en la naturaleza han sido descritas en términos de la sucesión de Fibonacci. Las ramas y las hojas de las plantas se distribuyen en el tallo buscando siempre optimizar su exposición al sol, la lluvia y el aire; cuando una planta crece produce hojas a espacios bastante regulares y normalmente ninguna hoja crece directamente encima de la anterior para permitir que todas reciban la luz y humedad necesarias. Las hojas y ramas se distribuyen a veces formando una espiral alrededor del tallo y para ver una de tales estructuras justo encima de otra, dependiendo de la especie, tenemos que dar una, dos, tres, cinco u ocho vueltas al tallo. Dicho de otra forma, podemos encontrarnos que cada hoja está separada de la anterior por  $1/2$ ,  $1/3$ ,  $2/5$ ,  $3/8$ ,  $5/13$  etc. de círculo, o lo que es lo mismo  $180^\circ$ ,  $120^\circ$ ,  $144^\circ$ ,  $135^\circ$ ,  $138^\circ$ ,  $128^\circ$ ; el denominador de estas fracciones representa el número de hojas y el numerador, el número de vueltas que da la hélice alrededor del tallo hasta alcanzar la misma posición. Casi siempre, las fracciones están formadas por números consecutivos o alternos en la sucesión de Fibonacci. Por ejemplo, la razón  $1/2$  ( $180^\circ$ ) es típica de gramíneas,  $1/3$  ( $120^\circ$ ) de ciperáceas,  $2/5$  de *Rosa*, *Corylus* y *Betula*,  $3/8$  de *Aster*, *Brassica* y *Plantago*,  $5/13$ , de *Sempervivum* (Strasburger *et al.*, 1974). El nombre de filotaxia se debe a Charles Bonnet en su tratado *Recherches sur l'usage des feuilles* (1754).

## Relación entre el número $\phi$ y la sucesión de Fibonacci

Kepler descubrió que la sucesión de las proporciones entre dos números de Fibonacci consecutivos converge a la proporción áurea. De modo más explícito, si dividimos cada número por el que le precede en la sucesión de Fibonacci, a medida que avanzamos, la proporción obtenida va oscilando (siendo alternativamente mayor o menor) pero se va acercando al valor de  $\phi$  (tabla 1).

1/1	2/1	3/2	5/3	8/5	13/8	21/13	34/21
1,000000	2,000000	1,500000	1,666667	1,600000	1,625000	1,615385	1,619048
55/34	89/55	144/89	233/144	377/233	610/377	987/610	
1,617647	1,618182	1,617978	1,618056	1,618026	1,618037	1,618033	

Tabla 1.- Resultado de la división de números sucesivos de la sucesión de Fibonacci.



Cuanto más avanzamos en las divisiones son más los decimales que coinciden con los del número  $\phi$ ; por ejemplo

$$\frac{F_{40}}{F_{39}} = \frac{102334155}{63245986} = 1,61803398874989$$

Si construimos un bloque con cuadrados en los que la longitud de sus lados vaya aumentando según la sucesión de Fibonacci obtenemos un rectángulo que según va creciendo se aproxima al rectángulo áureo (figura 7).

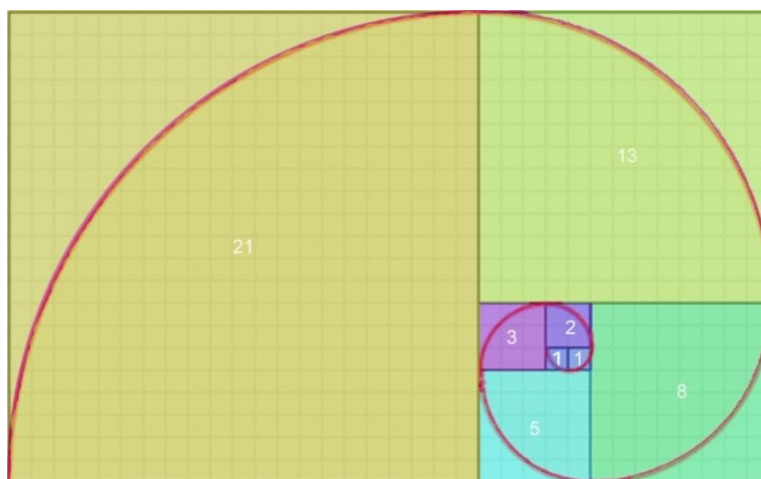


Figura 7.- Bloque de cuadrados en los que la longitud de los lados aumenta según la sucesión de Fibonacci. Al ir añadiendo cuadrados la relación largo-ancho de la figura se acerca a la proporción áurea.

Si nos fijamos en la disposición de las flores en las inflorescencias de la familia *Asteraceae*, o en las escamas en las piñas, como ya hemos dicho dispuestas con un ángulo de  $137,5^\circ$ , encontramos que el número de espirales se ajusta a parejas consecutivas de términos de esta sucesión. El número de espirales depende del tamaño del girasol; lo más usual es que haya 34 en una dirección y 55 en la otra (figura 4), pero se han observado girasoles con cocientes de números de espirales iguales a  $89/55$  y  $144/89$ , proporciones que son de números adyacentes en la sucesión de Fibonacci. Y cualquier variedad de piña presenta siempre un número de espirales que coincide con dos términos de la sucesión, 8 y 13; ó 5 y 8.

### 1.3. Magnitudes

El *Bureau International des Poids et Mesures* (BIPM) es el encargado de proporcionar la base para un único sistema coherente de las mediciones. El BIPM, fue establecido por el artículo 1 de la Convención del Metro el 20 de mayo de 1875. El sistema métrico decimal, que data de la época de la Revolución Francesa, está basado en el metro y el kilogramo. En la convención de 1875, se hicieron los nuevos prototipos internacionales del metro y del

kilogramo y fueron adoptados formalmente por la primera Conferencia General de Pesas y Medidas (CGPM) en 1889. Con el tiempo este sistema se fue desarrollando, de modo que ahora incluye siete unidades básicas. En 1960 se decidió que debería ser llamado el Sistema Internacional de Unidades (SI). El SI no es estático sino que ha ido evolucionando para adaptarse a un mundo cada vez más exigente con la precisión en las mediciones a todos los niveles y en todos los ámbitos de la actividad humana.

El sistema internacional de unidades (SI) tiene dos tipos de unidades: las básicas y las derivadas.

Las unidades básicas son siete y proporcionan la referencia utilizada para definir todas las unidades de medida del SI (tabla 2).

Magnitud básica	Unidad	Símbolo
Longitud	metro	m
Masa	kilogramo	kg
Tiempo	segundo	s
Intensidad de corriente eléctrica	amperio	A
Temperatura termodinámica	kelvin	K
Cantidad de sustancia	mol	mol
Intensidad luminosa	candela	cd

Tabla 2.- Magnitudes básicas del SI con sus unidades básicas y símbolos correspondientes.

Las unidades derivadas se definen como potencias o productos de potencias de las unidades básicas y se utilizan para medir magnitudes derivadas (tabla 3).

Magnitud derivada	Símbolo	Unidad derivada	Símbolo
Superficie	$A$	metro cuadrado	$m^2$
Volumen	$V$	metro cúbico	$m^3$
Velocidad	$v$	metro por segundo	m/s
Aceleración	$a$	metro por segundo cuadrado	$m/s^2$
Densidad	$\rho$	kilogramo por metro cúbico	$kg/m^3$
Concentración	$c$	mol por metro cúbico	$mol/m^3$
Índice de refracción	$n$	adimensional	

Tabla 3.- Algunas de las magnitudes derivadas en el SI.

Las magnitudes adimensionales, también llamadas magnitudes de dimensión uno, generalmente aparecen como el cociente de dos cantidades de la misma clase (por ejemplo, índice de refracción, es la relación de dos velocidades). Así, la unidad de una magnitud

adimensional es la razón de dos unidades del SI idénticas, y por lo tanto es siempre igual a uno. Sin embargo, al expresar los valores de magnitudes adimensionales la unidad uno no se escribe.

A algunas unidades derivadas que se utilizan con frecuencia se les da un nombre y un símbolo especial, siendo esta una forma para la expresión de combinaciones de unidades básicas. Hay 22 nombres especiales autorizados para su uso por el SI para las unidades derivadas; por ejemplo para la frecuencia se utiliza el hercio (Hz), para el ángulo plano el radián (rad), para la temperatura el grado Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), para la resistencia eléctrica, el ohmio (ohm), etc. ...

### 1.3.1. Magnitudes en Biología y en Morfología

El estudio de la Biología comprende desde las moléculas hasta los ecosistemas. Entre las magnitudes más frecuentes en Biología se encuentran el número de elementos presentes en una muestra y las relacionadas con el tamaño de los mismos. El número de elementos presentes se calcula mediante un recuento y sirve para estimar la composición de una muestra biológica que puede oscilar entre una preparación de virus, una población de bacterias y la complejidad de un ecosistema.

El tamaño de un elemento cualquiera dentro de una muestra biológica podemos determinarlo por la longitud, por el área o por el volumen. Al utilizar imágenes digitales aparece una nueva unidad de superficie que es el píxel. El píxel es cada unidad de información dentro de la imagen, y si conocemos la escala a la que se tomó la imagen, podemos transformar los píxeles en unidades de longitud.

Ciertas magnitudes de uso frecuente en Biología se relacionan con la descripción de las circunstancias ambientales (temperatura, presión, concentración de sales, iones y nutrientes,...). El pH es el logaritmo con signo cambiado de la concentración del ion hidrógeno y determina muchas características notables de la estructura y de la actividad de las macromoléculas biológicas y, por tanto, de la conducta de las células y de los organismos. Otras magnitudes reflejan actividades celulares en referencia al metabolismo (tasa de consumo o de producción de una determinada molécula, actividad enzimática,...). Las unidades utilizadas para expresar dichas magnitudes tienen que ver con las técnicas utilizadas (radiación, espectroscopia,...).

Nuestro trabajo se centra en el análisis de la forma y por tanto nos interesan especialmente las magnitudes útiles para su descripción. En primer lugar tenemos magnitudes clásicas a las que nos referiremos como relaciones geométricas y que son: superficie/volumen, largo/ancho; índice de curvatura e índice de circularidad. Después veremos aquellas magnitudes que se derivan del análisis digital. Asimismo describimos una aproximación al estudio de la forma original del presente trabajo.

### 1.3.2 Relaciones geométricas

#### Relación superficie/volumen (longitud/anchura)

La superficie es una magnitud bidimensional mientras que el volumen es tridimensional. El aumento en superficie es proporcional al cuadrado del aumento en las dimensiones lineales (largo  $\times$  ancho) mientras que el aumento en volumen es proporcional al cubo de dichas dimensiones (largo  $\times$  ancho  $\times$  alto). En consecuencia, cuando un cuerpo aumenta de tamaño la relación superficie/volumen disminuye. En una esfera la superficie es igual a  $4\pi r^2$  y el volumen es  $\frac{4}{3}\pi r^3$ ; por lo tanto la relación superficie/volumen es igual a  $3/r$ , lo que refleja que cuando una esfera aumenta de radio la relación superficie/volumen disminuye.

La relación entre longitud y anchura es un índice de la forma en los objetos bidimensionales y tiene un valor igual a la unidad en el círculo. El círculo es la forma geométrica que para un perímetro dado encierra un área mayor.

Un problema particular consiste en la distribución de espacio entre unidades de la manera más eficaz. El resultado es la distribución en panal con unidades hexagonales (figura 8).

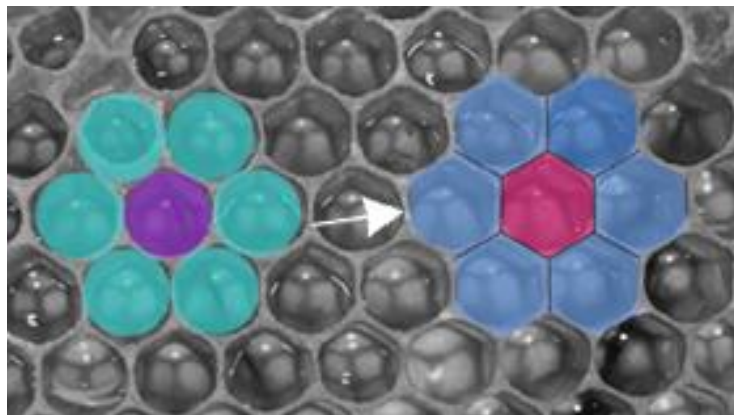


Figura 8.- Panal de abejas. En principio las celdillas son circulares pero la forma que adoptan para que no queden huecos es la hexagonal.

Aunque el ejemplo más conocido de compactación hexagonal son los panales de las abejas, existen otros. Así, en un cultivo en medio líquido las células tienden a una forma circular pero cuando se unen unas a otras formando agregados tienden a adoptar la forma hexagonal. En los tejidos, las células adoptan formas muy diversas según la función que desempeñe el tejido y la célula dentro de ese tejido. Si lo que se busca es la eficacia en el empaquetamiento, es decir el máximo aprovechamiento del espacio con el menor gasto de materiales, entonces las células toman la forma hexagonal (D'Arcy Thompson, 2003).

## Índice de circularidad

El índice de circularidad (Schwarz, 1980) nos permite medir el parecido de una figura plana con un círculo:

$$I = 4\pi \frac{\text{área}}{(\text{perímetro})^2}$$

El valor de dicho índice para cualquier figura está comprendido entre 0 y 1, siendo 1 el valor del círculo. No obstante hay que tener en cuenta que dos figuras pueden tener el mismo índice de circularidad y sus formas ser muy diferentes. Además, dos círculos tendrán el mismo índice de circularidad (1) pero serán diferentes si sus radios son diferentes. Al cambiar el tamaño, cambian sus relaciones perímetro/superficie. En el caso de objetos tridimensionales varía la relación superficie/volumen que en los seres vivos está asociada con propiedades fisiológicas y es importante para la nutrición, intercambio de sustancias y en general, en toda su relación con el medio.

Para la descripción de líneas y superficies curvas es útil el índice de curvatura.

## Índice de curvatura

Una curva definida por una función vectorial  $r$  tal que  $r'(t) \neq 0$  tiene por vector unitario tangente  $T(t) = \frac{r'(t)}{|r'(t)|}$ , que indica la dirección de la curva, donde  $r'$  es la derivada de la función vectorial  $r$ .

El índice de curvatura en un punto dado es una medida de la rapidez con la que la curva cambia de dirección en dicho punto. Se define como la razón del cambio del vector tangente unitario con respecto a la longitud del arco y viene dado por

$$k(t) = \left[ \frac{T'(t)}{r'(t)} \right],$$

donde  $T$  es el vector unitario tangente y  $T'$  la derivada de  $T$ .

En el caso de la esfera (o del círculo) radios mayores implican índices de curvatura menores.

## Magnitudes obtenidas en el análisis digital de imágenes

En el análisis de imágenes por medios digitales buscamos obtener datos numéricos que nos permitan su estudio a partir de la imagen. Los datos que podemos obtener podemos clasificarlos en:

- Parámetros morfométricos, que son aquellos que determinan la forma, la topología del objeto.
- Parámetros densitométricos, los que cuantifican lo relativo a la intensidad lumínica del objeto.

Las magnitudes que podemos extraer de una imagen mediante el software de análisis de imagen son (Grau, 2003):

1. Centroide.- En Geometría es el centro de simetría de una figura.
2. Coordenadas de un objeto dentro de la imagen. Indican la posición que ocupa un punto (pixel) dentro de la imagen. Por ejemplo en nuestro laboratorio este parámetro ha sido útil para calcular la curvatura en el ápice de las raíces o en los polos de las semillas de *Arabidopsis* (Cervantes y Tocino, 2005).
3. Longitud y anchura de los objetos.
4. Factores que relacionan la longitud de los ejes.
5. Diámetro de Feret o diámetro de calibrador: es la distancia que existe entre dos tangentes a la partícula, paralelas entre sí y perpendiculares al eje de medida. Los primeros programas de imagen medían las proyecciones de los objetos sobre los ejes cartesianos se denominaban Feret X y Feret Y. Los programas actuales miden el conjunto de proyecciones del objeto sobre uno de los ejes de coordenadas, haciendo rodar el objeto sobre su centro de masas. De entre todas las proyecciones del objeto las de mayor y menor magnitud se denominan Feret máximo y Feret mínimo respectivamente.

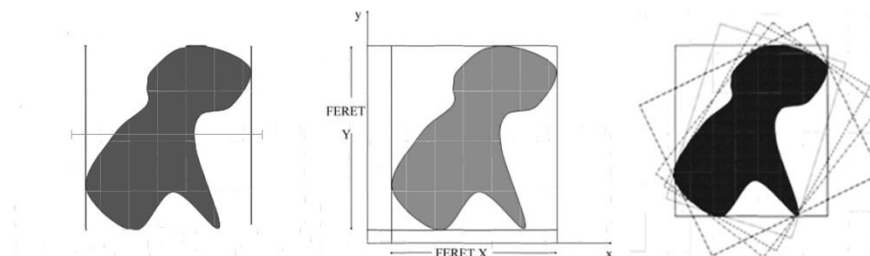


Figura 9.- Medidas de los diámetros de Feret mediante un programa de análisis de imagen.

6. Perímetro de un objeto.
7. Área de un objeto.
8. Índice de circularidad.
9. Rugosidad para estimar la irregularidad de los objetos.

### Índices morfométricos originales del presente trabajo

Finalmente describimos la aproximación al estudio de la forma que se ha utilizado en el presente trabajo. Medir la forma consiste en cuantificar el parecido de una forma problema con un objeto geométrico que se toma como referencia. Podemos colocar una figura geométrica

sobre una imagen y calcular el área que coincide y así comparar con otras formas similares. Este procedimiento, que ha sido desarrollado y aplicado en este trabajo, requiere la definición previa de un modelo geométrico con el que pueda compararse la muestra problema, y constituye lo que en el siguiente capítulo llamamos Interpretación geométrica de las formas. Para evaluar el parecido entre el objeto geométrico y la forma problema hemos utilizado como magnitudes el índice J y el índice G definidos en Materiales y Métodos.





## 2. Morfología



## 2.1 Morfología: revisión histórica

Al observar los organismos en la naturaleza vemos que la variación consiste en primer lugar en la presencia de diferentes formas. Aunque algunos de sus principales resultados ofrecen, excepcionalmente, descripciones de formas, la Biología contemporánea se ha centrado más en la función y viene a contemplar a los seres vivos como medios en la producción: de bienes de consumo o de otros seres vivos semejantes. El estudio de la variación de las formas en la naturaleza ha sido relegado a un segundo plano a lo largo del siglo XX. En las ocasiones en que un autor trata de Morfología suele citar el libro titulado *On Growth and Form*, de D'Arcy Wentworth Thomson que se publicó por primera vez en 1917 siendo una excepción en una época en que la Biología es principalmente funcional. Comienza el capítulo preliminar de este libro indicando que, para Kant (1724-1804), la Química es una ciencia pero no la Ciencia y cita una frase de este autor: “El criterio para reconocer la verdadera ciencia radica en las Matemáticas”. Indicando que otros autores habían expresado opiniones semejantes entre los que menciona a Roger Bacon (1214-1294) y a Leonardo da Vinci (1452-1519). Más adelante vuelve a hablar de Kant, quien, al parecer, había dicho que es la naturaleza misma y no el matemático quien introduce las Matemáticas en la Filosofía Natural.

Las primeras descripciones de la naturaleza las encontramos entre los filósofos clásicos, en los que el análisis de la diversidad del mundo natural que les rodeaba incluye minerales, vegetales y animales además de aspectos de Geografía, Medicina y Astronomía. Tales obras recibieron el nombre de Historia Natural. Aristóteles (384-322 a.C.), dedicó buena parte de su obra a la Historia Natural (De la generación de los animales, Del movimiento de los animales, Historias de los animales). En Botánica una de las primeras obras que se conocen es la de Teofrasto (372-288 a.C.), discípulo de Platón y Aristóteles, que nos dejó dos libros principales: Historia de las plantas y Sobre las causas de las plantas. El primero de ellos, Historia de las plantas, está dividido en seis libros (originalmente fueron nueve), en los cuales examina más de 450 plantas que clasifica en relación con su aspecto exterior. Se distinguen así los árboles, los arbustos, los sub-arbustos y las hierbas. Plinio el viejo (23-79 d.C.) escribió su *Naturalis historia*, la primera recopilación conocida del saber de la antigüedad, que en 37 libros contiene los conocimientos relativos a Mineralogía, Astronomía, Geografía, Antropología, Zoología, Botánica y Medicina. En su prefacio, el autor afirma haber recogido 20.000 hechos recolectados de unos 2.000 libros incluyendo a 500 autores selectos tanto de la época romana como de civilizaciones anteriores como la egipcia o la griega. Dioscórides (40-90 d.C.), médico y farmacólogo griego, recopiló información sobre plantas curativas y describe unas 300 especies que clasificó en cuatro secciones: alimenticias, vinosas, medicinales y venenosas. Su clasificación se siguió hasta finales del siglo XV o principios del XVI.

Durante siglos, el estudio de los vegetales estuvo condicionado por sus propiedades alimenticias o curativas y no hubo una preocupación por establecer un orden o una clasificación de las plantas. En la introducción de Lamarck (1744-1829) a su *Histoire naturelle*

*des végétaux, classés par familles [...]* (Lamarck., 1805), al tratar de los estudios de las plantas en la antigüedad se lee:

*L'application qu'on donnait alors à l'étude des plantes, se réduisait entièrement à la recherche de leurs propriétés, et presque jamais au moyen d'assurer la connaissance de ces plantes par des marques distinctives non équivoques.*

(La aplicación que se hacía entonces al estudio de las plantas, se reducía por completo a la búsqueda de sus propiedades, y casi nunca como medio de asegurar un medio para conocer estas plantas por sus marcas distintivas e inequívocas).

Y, al tratar de Dioscórides, dice:

*Dioscoride, comme ses prédécesseurs, ne fit aucune tentative pour établir dans les plantes alors connues un ordre qui pût en quelque sorte les caractériser, et aider à les faire reconnaître: il range les plantes dont il traite, en considérant seulement leurs qualités et les propriétés qu'on leur a découvertes.*

(Dioscórides, como sus predecesores, no hizo ninguna tentativa por establecer entre las plantas entonces conocidas un orden que de alguna manera las caracterizase, ayudando a reconocerlas: ordena las plantas que trata, en consideración solamente a sus cualidades y las propiedades que se han descubierto).

Y más adelante:

*Cette confusion cependant produisit à la fin un bon effet. Car on fut obligé d'étudier les plantes elles mêmes, et de chercher à en connaître les caractères distinctifs, afin de parvenir à désigner, suffisamment celles dont on voulait parler; ce qui porta chacun à examiner les plantes de son pays, au lieu de se borner uniquement à l'étude des anciens livres,...*

(Esta confusión sin embargo al final produjo un buen efecto. Debido a que estábamos obligados a estudiar las plantas por sí mismas, y tratar de conocer las características distintivas, a fin de designar, suficientemente aquellas de las que se quería hablar, esto llevó a cada uno a examinar las plantas de su país, en lugar de limitarse únicamente al estudio de los libros antiguos).

*Ce ne fut qu'au commencement du seizième siècle qu'on essaya d'étudier réellement cette science, la plus aimable et la plus intéressante des trois parties de l'Histoire naturelle.*

(No fue hasta comienzos del siglo dieciséis cuando se trató de estudiar realmente esta ciencia, la más amable y la más interesante de las tres partes de la Historia Natural).

*Cesalpin, lorsque, dans le volume in 4° qu'il a publié en 1583 sur les Plantes, et qu'il divise en seize livres, cet auteur distribuait les huit cents végétaux ou environ mentionnés dans cet ouvrage, en quinze classes, toutes déterminées d'après des caractères distinctifs et apparents, et non d'après la considération des propriétés et des vertus des plantes dont il traite.*

(Cesalpino, cuando, en el volumen en 4º que publicó en 1583 sobre las Plantas, y que dividía en dieciséis libros, distribuyó los, cerca de, ochocientos vegetales mencionados en esta obra, en quince clases, todas determinadas según caracteres distintivos y aparentes, y no según la consideración de las propiedades y de las virtudes de las plantas que trató).

De Tournefort y su *Elements de Botanique* podemos leer:

*Ses Eléments de Botanique, imprimés au Louvre, en trois vol. in-8°, dont deux volumes de planches pour la représentation des fleurs et des fruits qu'il choisit pour déterminer ses genres. C'est dans ce bel ouvrage que ce célèbre botaniste donna sa méthode, la plus claire et la plus facile qui eût paru jusqu'alors.*

(Su libro *Eléments de Botanique*, impreso por el Louvre, en tres vol. en 8º entre los que están dos volúmenes de planchas para la representación de las flores y de los frutos que escoge para determinar sus géneros. Es en esta bella obra en donde este célebre botánico dio su método, el más claro y más fácil aparecido hasta entonces).

De la historia de los vegetales de Lamarck deducimos que hasta finales del siglo XV no hay constancia de que ningún autor hubiese intentado hacer una clasificación rigurosa y comprensiva de las plantas. Las descripciones abundan y se basan en su interés farmacológico o alimenticio.

## 2.2 La Morfología en Botánica

La formación de grupos subordinados y enlazados entre sí recibe el nombre de clasificación y nos sirve para agrupar los organismos. Una de las cuestiones mayores de la Historia Natural consiste en adaptar la clasificación con la realidad. Aquí puede ayudar de nuevo la frase de Kant que se indicó en el capítulo anterior: La clasificación es, como la Geometría, una actividad humana y es por lo tanto artificial, pero así como los objetos de la Geometría proceden de la naturaleza, también los principios que rigen la clasificación proceden de la naturaleza.

Hay muchas formas de clasificar los objetos (animados o no). Michel Foucault (1982) comienza el prefacio a su libro "Las palabras y las cosas" con una cita de Borges sobre la clasificación de los animales que dice haber encontrado en una enciclopedia china, y referente a esto dice:

*Este texto cita "cierta enciclopedia china" donde está escrito que "los animales se dividen en a] pertenecientes al Emperador, b] embalsamados, c] amaestrados, d] lechones, e] sirenas, f] fabulosos, g] perros sueltos, h] incluidos en esta clasificación, i] que se agitan como locos, j] innumerables, k] dibujados con un pincel finísimo de pelo de camello, l] etcétera, m] que acaban de romper el jarrón, n] que de lejos parecen moscas". En el asombro de esta taxonomía, lo que se ve de golpe, lo que, por medio del apólogo, se nos muestra como encanto exótico de otro pensamiento, es el límite del nuestro: la imposibilidad de pensar esto. Así, pues,*

*¿qué es imposible pensar y de qué imposibilidad se trata? Es posible dar un sentido preciso y un contenido asignable a cada una de estas singulares rúbricas;...*

¿Qué es aquello en lo cual resulta imposible pensar? o,...por el contrario, ¿qué es aquello lo cual resulta más fácil o adecuado pensar? Preguntas que a todos nos acercan a cuestiones que son familiares pero,... Aunque la taxonomía es fundamental en Historia Natural, no lo ha sido tanto en Biología. La primera consiste en la búsqueda de un orden en la naturaleza, orden que se debe buscar de acuerdo con los principios que rigen la clasificación.

Hay un orden natural al cual obedecen los organismos y la función del naturalista es describirlo de acuerdo a esos principios que rigen la clasificación y que como hemos mencionado antes se encuentran en la naturaleza.

Históricamente, algunas de las clasificaciones más importantes de las plantas son las de Tournefort, Linneo y Cavanilles.

Tournefort en 1694 estableció una clasificación que eclipsó a todas las anteriores. Ideó un sistema ingenioso con dos secciones basadas en la consistencia y magnitud de los tallos. Las dos secciones se dividen en 22 clases cuyos caracteres están fundados esencialmente en la forma de la corola (figura 10). El sistema es reconocido muchos años después y así Lamarck dice de él:

*Nous savons maintenant que la ligne de séparation, que Tournefort a voulu établir entre les fleurs campaniformes et les fleurs infundibuliformes, ne peut être admise.*

(Sabemos ahora que la línea de separación, que Tournefort estableció entre las flores campaniformes y las flores infundibuliformes, no puede ser admitida).

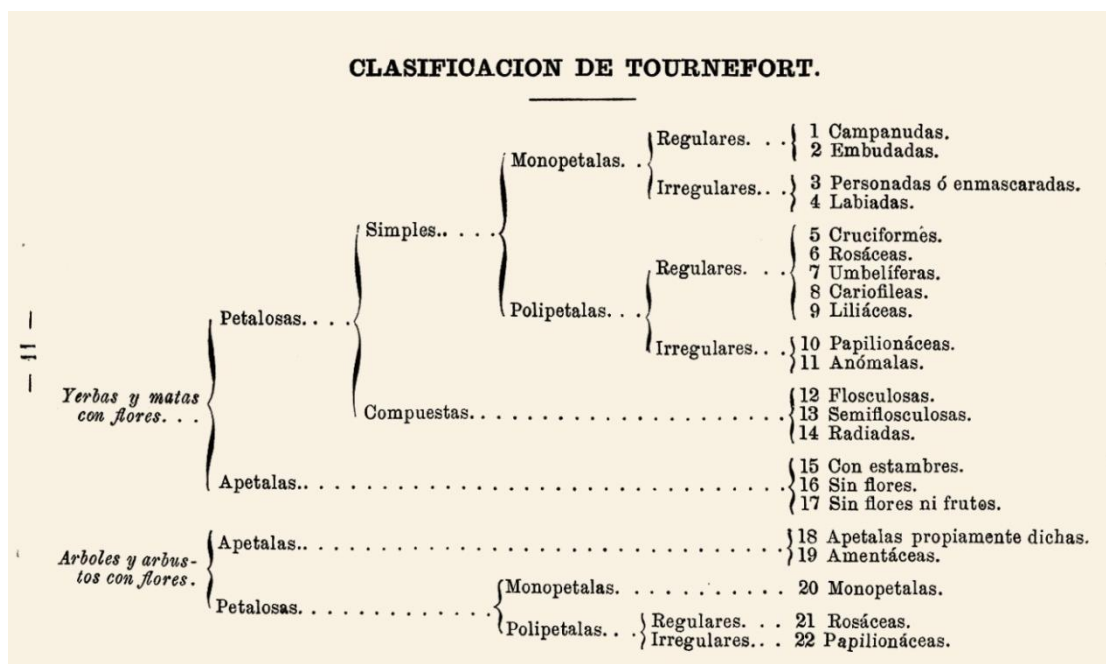


Figura 10.- Clasificación de las plantas según Tournefort.

A Linneo (siglo XVIII) se le atribuyen varias innovaciones centrales en la taxonomía. En 1735 estableció su clasificación artificial tomando por base los órganos sexuales. Desarrolló la nomenclatura binomial de los géneros y especies en conexión con una rigurosa caracterización morfológica de las mismas descritas ya en la primera edición de su libro, *Systema naturae* (1735). A partir de la décima edición de este libro se hace más común el uso del sistema de nomenclatura binomial (Linneo, 1758). En segundo lugar, promovió el uso de una terminología exacta, definiendo con precisión varios términos morfológicos que serían utilizados en las descripciones de cada especie o género, en particular aquellos relacionados con la morfología floral y del fruto (figura 11).



Figura 11.- Ilustración del sistema sexual de Linneo que apareció en la edición de 1736 de su obra *Species plantarum*. Como se lee al pie realizó los dibujos Georg D. Ehret.

Es también en el siglo XVIII cuando nace la morfología de las plantas como disciplina científica. En su obra “La metamorfosis de las plantas” (1790), Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832) introduce por primera vez el termino Morfología, como el estudio científico de la forma, y sienta la base para la morfología comparativa o tipología (estudio y clasificación de tipos, entendiendo por tipo una configuración abstracta unitaria). Su contribución más importante fue la idea de que, a pesar de toda la diversidad organográfica que presentan las plantas con flores, se puede deducir un plan fundamental de organización o “Bauplan” que daría coherencia a esta variedad morfológica (Kaplan, 2001). Para Goethe la diversidad de las formas puede ser reducida a una serie de «arquetipos» (Claßen-Bockhoff, 2001). Los estudios de Goethe en plantas son semejantes a los de Ettienne Geoffroy Saint Hilaire, quien proponía

también un plan de organización común para los animales. La *Philosophie Zoologique* de Lamarck, los trabajos de Goethe y de Geoffroy son la base para el estudio de la transformación de las especies. A tal fin, la Embriología es una disciplina fundamental y mucho más abierta al análisis experimental que la Paleontología.

Después de Goethe otros autores contribuyeron al desarrollo de la morfología de las plantas en Alemania. Fried-Erich Wilhelm Hofmeister Benedikt (1824-1877) fue el descubridor de la alternancia de generaciones y estudió la embriología de las plantas.

La principal contribución de Hofmeister en el campo de la morfología de las plantas fue su libro *Allgemeine Morphologie der Gewächse* (Morfología General del Crecimiento; Hofmeister, 1868) publicado como parte de la serie titulada *Handbuch der physiologischen Botanik* (Manual de botánica fisiológica). En ella intentó dar una interpretación biofísica de una serie de fenómenos, como la filotaxia, los efectos de la gravedad y de la luz en la morfología de las plantas.

Entre las figuras más importantes en el estudio de la morfología de las plantas en Alemania, se encuentra Wilhelm Georg Julius Hubert Troll (1897-1978). Fue el primero en dar una visión general de la diversidad en las formas de las plantas.

Tanto para Troll, como para Goethe, el objetivo central de la Morfología es el análisis de la diversidad y la deducción de tipos (figura 12; Claßen-Bockhoff 2001). Este enfoque tipológico es básicamente un proceso intuitivo que será evidente para el investigador una vez analizado el espectro de variantes de las formas. Al igual que Goethe, Troll admite que los tipos son reales, no sólo abstracciones, y que están detrás de la diversidad observada en el mundo físico. Dedicó su vida al estudio de la morfología comparativa de las plantas y a la reducción de la diversidad en las plantas a unos pocos tipos definidos.

Troll se mostró crítico con algunos aspectos de las teorías evolutivas en boga. Consideraba que la forma era más importante que la genealogía. Las tipologías fundamentales eran expresiones naturales y los sistemas de clasificación podrían basarse en ellas. El plan de organización o "Bauplan" del grupo de organismos en cuestión tiene que ser tenido en cuenta en cualquier consideración de la evolución de las plantas (Kaplan y Groff, 1995). Al igual que von Goebel y Hofmeister, las principales contribuciones y perspectivas de Troll estaban contenidas en su mayor tratado multivolumen titulado *Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen* (Morfología comparada de las plantas superiores; Troll *et al.*, 1937-1943), en el que destacan la calidad y la claridad de sus ilustraciones y de la fotografía. Un testimonio de su calidad es el gran número de textos modernos no alemanes que han recurrido a las figuras de las obras de Troll (por ejemplo, Strasburger *et al.* (1974); figura 12B).



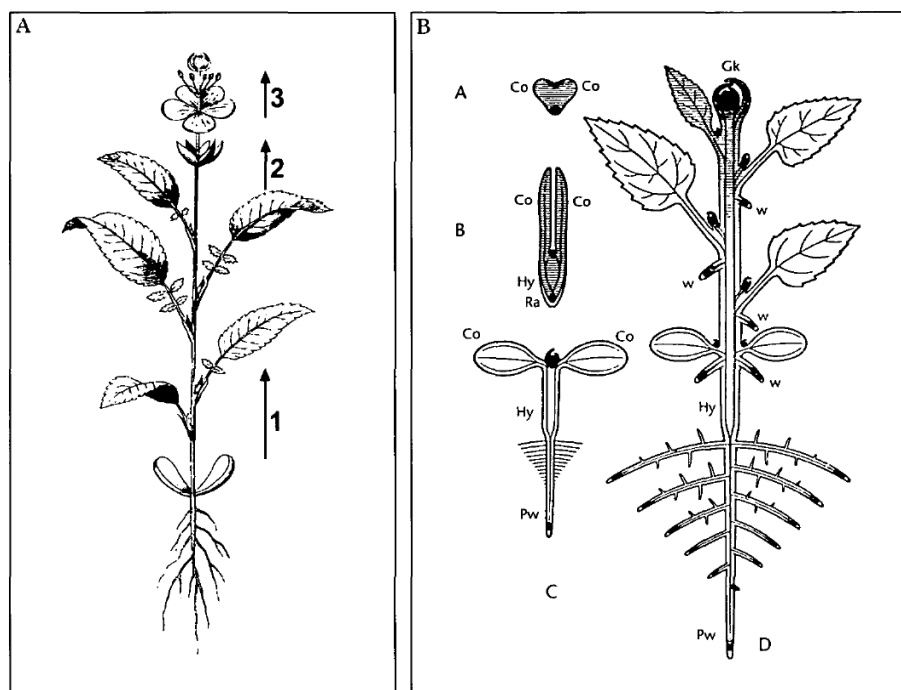


Figura 12.- Interpretación de la forma de las plantas. (A), Ilustración del arquetipo de Goethe para una planta anual. Las flechas indican los tres pasos de la metamorfosis. (B), El "Tipo de Organización" en Angiospermas aplicado por Troll. La representación idealizada de la sección mediana longitudinal de una dicotiledónea ilustra la relación entre el sistema de brotes distales y el sistema de raíces proximales. Las aéreas sombreadas presentan regiones en proceso de crecimiento, las áreas más intensamente sombreadas representan regiones con mayor actividad meristemática.

La biología más reciente sigue las tendencias globales de la Genómica. Por un lado, la biología contemporánea pone más énfasis en herramientas y tecnología que en otros enfoques fundamentados filosóficamente. Con el advenimiento de las técnicas moleculares en décadas recientes, esta brecha se ha hecho aún más grande. Una vez secuenciados los genomas resulta que los datos de secuencia dejan muchas preguntas sin respuesta. Es el momento de apreciar que los organismos son unidades biológicas que merecen nuestra atención. En consecuencia, la Morfología puede ser apreciada y respetada como una clave para la comprensión de la Biología.

La figura 13 está tomada de Kaplan (2001) e ilustra la relación de la morfología de las plantas con otras disciplinas de la Botánica. El campo de la morfología de las plantas, representado como una esfera central, se superpone con la Sistemática, con la que hay un intercambio mutuo de información. La Sistemática utiliza las características morfológicas para detallar la diversidad en sus subunidades taxonómicas.

Además de la Sistemática, es importante la relación de la Morfología con otros tres campos fundamentales de la biología de las plantas (Ecología de las plantas, Genética y Fisiología). Como indican las flechas de la figura, la influencia o el intercambio de información se produce en los dos sentidos. Dado que la morfología de las plantas tiene su origen en la

historia natural de las plantas, hay una conexión con la Ecología y con el análisis de la vegetación correspondiente. De hecho, históricamente, los grandes morfólogos de plantas también fueron grandes geógrafos de plantas y ecólogos (por ejemplo, Andreas Franz Wilhelm Schimper y Eugen Warming).

La relación entre forma y función une la Morfología con la Fisiología y, al igual que ocurre con la Ecología, algunos morfólogos de plantas fueron también grandes fisiólogos vegetales (por ejemplo, Hofmeister, Sachs, Troll).

La Genética precisa de la Morfología para la caracterización de los distintos fenotipos. Dentro de la Genética Molecular se puede constatar un interés creciente en los aspectos causales de la morfogénesis vegetal. Los experimentos de Mendel estaban basados en la descripción precisa de características en las plantas de guisante. Entre estas características se encontraba la forma de sus semillas. La descripción de la forma se encuentra así en los orígenes de la Genética.

Hoy en día, la investigación en morfología de las plantas recibe poca atención directa por parte de la comunidad científica, más centrada en disciplinas que la utilizan como herramienta. Esto no quiere decir que en el campo de la Morfología no haya más trabajo por hacer, el estudio de la morfología de las semillas puede ayudar en su clasificación.

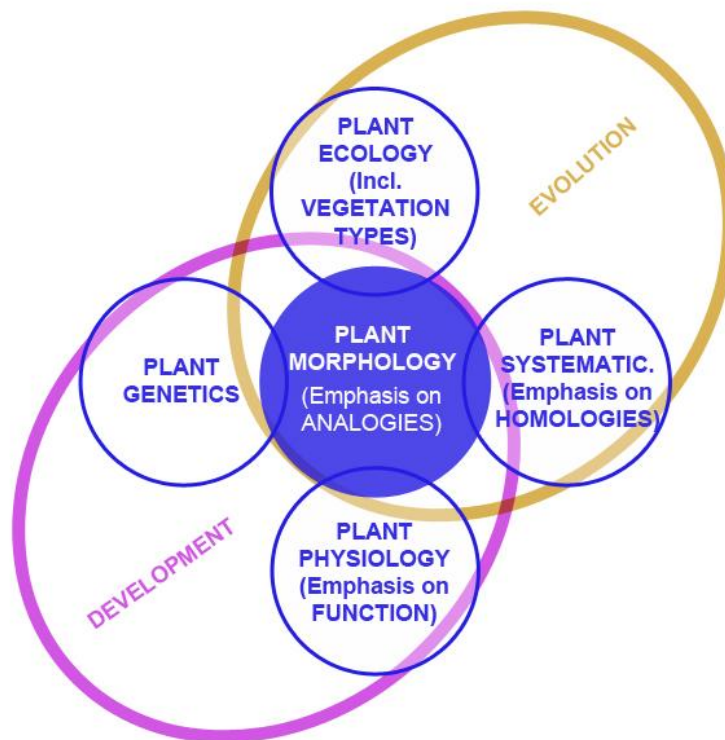


Figura 13.- Interacción de la morfología de las plantas con otras disciplinas.

## 2.3 Interpretación geométrica de las formas

El análisis de la forma es, como veíamos, clave para la taxonomía, y ha de tener un papel importante en Biología. Las diferencias en la forma entre individuos o partes de estos pueden indicarnos diferencias en su desarrollo producidas por alteraciones en procesos biológicos o en respuesta a las condiciones ambientales. Además, la Morfología aporta un criterio fundamental para la clasificación.

La descripción de la forma de los objetos naturales se hace mediante la comparación con formas geométricas (la espiral, la hélice, el círculo, el óvalo, el hexágono,...). No es que se busquen en la naturaleza tales objetos, sino que, al contrario y como decía Kant, es la naturaleza quien los ha suministrado. Aunque tal aproximación se encuentra en algunos ejemplos históricos y sirve de base para la descripción de animales y plantas, suele ser por lo general poco precisa limitándose a una descripción del aspecto general de algo (espiral, helicoidal, circular, ovalado, hexagonal, lenticular). Por lo general falta el dato numérico (magnitud), que permita comparar la forma de los objetos con la de su modelo y así poder medir diferencias entre conjuntos de objetos. En el caso de semillas, el análisis de la forma permite comparar entre las semillas del mismo fruto, entre las de frutos distintos de la misma planta, entre plantas de diferentes variedades o especies; entre semillas de la misma variedad pero que han sufrido alguna mutación y en distintas fases de desarrollo o creciendo bajo diferentes condiciones ambientales.

En la introducción a su clasificación de las semillas, A.C. Martin (1946) dice: "La ciencia Botánica moderna ha hecho grandes progresos en los últimos 150 años pero durante este período algunas partes de la Botánica han permanecido inactivas. Entre estos campos cabe destacar el de la morfología comparativa de las semillas".

En este trabajo analizaremos la morfología de semillas de distintas especies de plantas para ver las diferencias entre distintas variedades o mutantes dentro de cada especie. Los métodos desarrollados para el análisis de la forma se aplican en primer lugar a especies-modelo. El desarrollo de la Genética y de las técnicas de biología molecular ha servido para definir a *Arabidopsis thaliana* como el modelo general de plantas y entre las leguminosas, *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* son las especies de referencia. La descripción cuantitativa de la forma de las semillas en estas especies puede ser el punto de partida para múltiples aplicaciones posteriores.



### 3. Especies modelo



### 3.1. Modelos

Platón en su libro *Timeo* (1872) habla sobre la formación del cosmos para lo cual el demiurgo se habría fijado en un modelo inmutable eterno. Toma como figura geométrica básica el triángulo y uniendo triángulos se obtienen otras figuras geométricas, llegando a formar cuerpos sólidos tridimensionales asociados a cada uno de los elementos que, según él, forman el universo asignando el cubo a la tierra, el tetraedro al fuego, el octaedro al aire y el icosaedro al agua. Dejando para el universo la esfera por ser “la más perfecta y semejante a sí misma de todas las figuras”.

Los modelos son importantes en múltiples aspectos de la vida. Platón, en el *Timeo*, los utiliza para explicar la formación del universo. En ciencia, en general, el concepto de modelo también es importante y se ha utilizado desde antiguo. Según especialistas en Historia de la ciencia, como Duhem (1978) y Rossi (1986) los modelos aparecen por primera vez, en la ciencia tradicional en Inglaterra, como elementos que se introducen para conectar mejor con una teoría, para que esta sea concreta y comprensible. Por ejemplo, Rossi, (1986) describe cómo Faraday para representar su hipótesis de atracción electrostática imaginó una serie de cuerdas elásticas indicando que este modelo fue muy estimado y admirado por Maxwell.

Por una parte los modelos matemáticos intentan, a través de representaciones ideales, dar una explicación simple de situaciones complejas en la naturaleza. Un resumen de la aplicación de modelos matemáticos en el desarrollo de plantas ha sido dado por Alvarez-Buylla *et al.* (2007). Además, los libros *Stabilité structurelle et morphogénèse* (estabilidad estructural y morfogénesis), de René Thom (1977), y *Mathematical Biology I. An Introduction*, de JD Murray (2002) son textos clásicos sobre los modelos matemáticos en la interpretación de la naturaleza (Cervantes, 2008).

Por otra parte, la investigación biológica desde finales del siglo XIX se basa en la experimentación. Investigar los procesos biológicos en el laboratorio es diferente a la observación de la naturaleza. Para el trabajo en el laboratorio se ha de disponer de materiales adecuados y de determinados organismos. Todos los seres vivos no se adaptan por igual a la vida en condiciones controladas propias de un laboratorio de investigación. Así por ejemplo sería inconcebible que fuera a utilizarse el elefante o la ballena como animal de laboratorio para investigar las rutas metabólicas generales o la respiración mitocondrial. La biología molecular ha tenido siempre esta vocación de unificación y a menudo se ha partido de la base. Como decía Jacques L. Monod, lo que es cierto para *Escherichia coli*, lo es también para el elefante. Una afirmación de gran interés práctico pero que deja en el aire ciertas dudas, por ejemplo las que se refieren a cuánto se parecen los seres vivos criados y mantenidos en condiciones de laboratorio a sus progenitores naturales. Se han buscado así organismos óptimos para resolver los mecanismos de la vida (bioquímicos, genéticos, fisiológicos, etc.). Tales organismos de experimentación son piezas-clave para la investigación. El hecho de llamarlos organismos-modelo lleva implícita cierta idealización. En cierta forma existe el deseo

de desvelar las características biológicas fundamentales que comparten los seres vivos, pero este deseo parte de la creencia de que existen dichas características biológicas fundamentales y que ellas son compartidas. Que esto sea cierto para algunas de dichas características, así por ejemplo todos los seres vivos tienen ADN y proteínas de estructura y funciones muy conservadas, no significa que lo sea para todas ellas. En este caso, se trata de modelos materiales, en contraposición a los modelos abstractos o conceptuales (como los matemáticos).

Los organismos-modelo han sido ampliamente utilizados y han permitido la obtención de una gran cantidad de información. La investigación centrada en estos organismos plantea sin embargo algunas cuestiones científicas y filosóficas. Por un lado, los organismos modelo representan sólo una pequeña fracción de la biodiversidad que existe en el planeta. Se asume que el conocimiento de estos organismos permite extrapolar la información obtenida al resto de organismos lo cual tiene serias limitaciones.

En la elección de organismo como modelo en el laboratorio se ha considerado su abundancia y su facilidad de cultivar/criar, y manipular en el laboratorio. En este sentido el organismo modelo por excelencia ha sido la bacteria *Escherichia coli*, fundamental en el desarrollo de la Bioquímica, la Genética y la Biología molecular a lo largo del siglo XX. En Genética muchos avances se han conseguido con la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y en biomedicina con *Mus musculus*, el ratón, y más recientemente el pez cebra *Danio rerio*. Todos estos organismos presentan características distintivas e interesantes para el estudio de determinados procesos (fácil y rápido crecimiento, embriones de gran tamaño, linaje celular fijo, transparencia, etc.). Por otra parte ciertas propiedades como su corto ciclo vital y su facilidad de manipulación, advierten sobre las diferencias de los postulados organismos-modelo con sus representados, recuerdan que en ciencia es peligroso hacer generalizaciones infundadas y sobre todo llaman la atención sobre algo que a veces los biólogos parecen haber olvidado: que la naturaleza no es una granja ni un laboratorio por lo que las conclusiones del método científico siempre tienen un alcance limitado.

### 3.2. Plantas modelo: definición y características

Una especie modelo es la especie de cualquier grupo taxonómico de organismos vivos que es escogida como referencia. Al escoger una especie como modelo de todo un grupo taxonómico se busca concentrar los esfuerzos para su estudio.

El organismo modelo se selecciona por ser representativo de todos los elementos del conjunto (tiene características comunes a todos los elementos), y además porque tiene características que hacen que sea más fácil de analizar cualquier proceso dado (facilidad de manipulación). Implícitamente en la selección de un organismo modelo está el concepto de facilidad. Una vez escogido un organismo modelo dentro de un grupo taxonómico, su análisis ayuda a entender mejor todos los elementos. Una de las ventajas de seleccionar un organismo



modelo es que todo el trabajo se realiza sobre él y esto nos ayudará a definir mejor las técnicas y protocolos para su estudio, la canalización del trabajo da como resultado la generación de los recursos necesarios para simplificar su posterior análisis. Pero... ¿hasta qué punto podemos extrapolar los resultados obtenidos con estos organismos al resto del grupo?

Entre las plantas, hay diversos modelos propuestos en respuesta a los intereses particulares de investigación. Así, para las Monocotiledóneas, maíz, trigo y arroz fueron los modelos considerados durante algún tiempo. Actualmente, el modelo predominante para las Monocotiledóneas es el arroz (*Oryza sativa*), principalmente debido a su genoma más pequeño (Goff, 1999; Goff *et al.*, 2002). En leguminosas, el modelo histórico es el guisante (*Pisum sativum*), a causa de la amplia aplicación agrícola, de un genoma relativamente pequeño y de que fue la especie de los experimentos de Mendel, pero en la era de la genómica, *Lotus japonicus* (Asamizu *et al.*, 2004) y *Medicago truncatula* (Bell *et al.*, 2001) se convirtieron en las especies de elección debido a un genoma más pequeño que el del guisante. Otras plantas se han estudiado con fines particulares como por ejemplo la soja, el tomate, las espinacas y *Antirrhinum*.

Con todo, el modelo principal en plantas es *Arabidopsis thaliana* (figura 14). Sus propiedades como tal modelo general fueron detalladas por el Comité Directivo Multinacional de *Arabidopsis* (*Multinational Arabidopsis Steering Committee*, 2002).

Tanto simplicidad como facilidad, características altamente deseadas en un modelo, están presentes en *Arabidopsis* y esto puede tener un efecto adicional no deseado que hace que las cosas se vean más simples de lo que realmente son. Primero vamos a discutir el significado de las palabras sencillo y fácil, después de lo cual podemos entender mejor por qué el trabajo con sistemas modelo puede hacer que veamos las cosas más simples de lo que son.

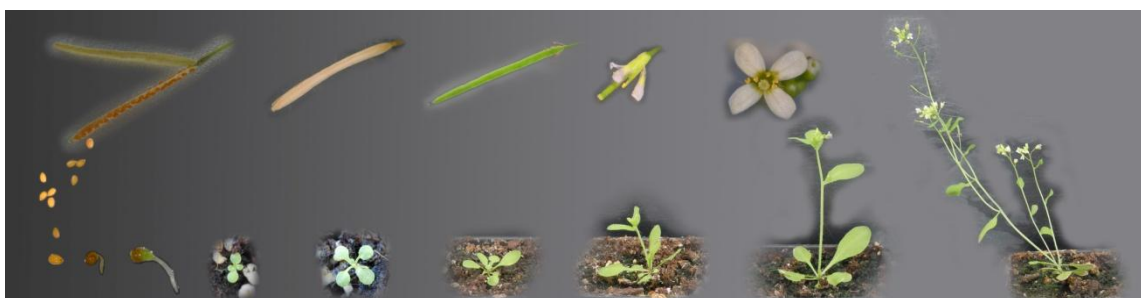


Figura 14.- *Arabidopsis thaliana*. Su ciclo de vida tarda aproximadamente dos meses en completarse.

La palabra simple tiene dos significados: Uno, más evidente, se refiere a que algo está formado por un solo elemento en contraposición a compuesto. Con este significado la palabra simple es muy utilizada en Botánica para designar algo que no tiene partes (flor simple, flor compuesta...). El otro significado, más complejo; está relacionado con sencillo, sin complicaciones ni dificultades y es lo que se busca en un modelo que idealice la realidad. En

este sentido, los objetos o los procesos del mundo natural no son simples o complejos de una manera objetiva: su complejidad es relativa y depende de nuestro punto de vista. Podemos percibir algo como "simple", pero si cambiamos nuestro punto de vista, nuestros criterios o nuestro método de aproximación, éste puede llegar a ser complejo. Una gota de agua puede ser vista como una entidad extremadamente compleja cuando se observa bajo un determinado tipo de consideraciones químicas, mientras que la luna puede ser vista como un simple objeto en virtud de un telescopio con una óptica pobre.

El significado de Fácil está relacionado con el segundo significado de Simple y cuando decimos, por ejemplo, que el análisis de la floración en *Arabidopsis* es más sencillo que en otra planta, queremos decir que nos costará menos esfuerzo en *Arabidopsis* obtener una cierta cantidad de información, unos resultados o llegar a nuevas conclusiones. Esto se basa en el hecho de que *Arabidopsis* ofrece facilidades y recursos no disponibles en otras plantas. Sin embargo, es importante hacer notar aquí que no sólo los resultados, sino también nuestras conclusiones dependerán de nuestros recursos. También las hipótesis que forman nuestro punto de partida estarán fuertemente influenciadas por nuestros recursos. Trabajar con una especie consolidada como una planta modelo, como *Arabidopsis*, nos obliga a trabajar en los aspectos que se nos presentan de una forma más directa o consolidada para desarrollar un proyecto de éxito, y no con los que se podrían considerar más interesantes antes o en ausencia de tal modelo.

### 3.3. Modos de reproducción en las plantas

La reproducción en lo relativo a los seres vivos es engendrar y producir otros seres con los mismos caracteres biológicos. Los organismos vivos tienen dos formas de reproducirse, asexual o sexualmente. La reproducción asexual es aquella en la que un organismo o una parte de él da lugar a otro idéntico al anterior, con idéntico genotipo, mientras que en la reproducción sexual hay un intercambio de material genético entre dos individuos de la misma especie y como consecuencia de este intercambio se forma un nuevo individuo que tendrá caracteres de ambos progenitores. En las plantas nos encontramos con los dos tipos de reproducción.

Entre las distintas formas de reproducción asexual o multiplicación vegetativa en los vegetales superiores tenemos como ejemplos la multiplicación por estolones y por bulbillos. Los estolones son ramificaciones laterales de los tallos que emiten raíces y acaban separándose de la planta madre por rotura o descomposición; los bulbillos son yemas de naturaleza foliar que se desprenden de la madre y producen nuevos individuos.

Otra forma de reproducción asexual en plantas es la formación de semillas por apomixia. Algunas plantas han desarrollado un medio de producción de semillas sin fertilización o sin la meiosis, este proceso se llama agamospermia ("semillas sin matrimonio"). La agamospermia se ha registrado en 34 familias, pero es especialmente frecuente en las especies que pertenecen

a géneros como *Taraxacum*, *Hieracium* y *Crepis* de las familias *Asteraceae* y *Alchemilla*, *Sorbus* y *Rubus* de la familia *Rosaceae*. En estas especies, las semillas de una planta individual comparten el genotipo con la planta madre y entre sí. (Fenner y Thompson, 2005).

La reproducción sexual incluye la fusión de dos células diferentes (gametos) cada una de ellas con su dotación cromosómica correspondiente; de esta manera los organismos no solo aseguran la producción de nuevos individuos, sino que también hay una renovación y variación constante de la constitución genética de los mismos. En las plantas superiores la reproducción sexual se lleva a cabo en estructuras especializadas, las flores. Desde el punto de vista morfológico la flor se interpreta normalmente como una rama esporofítica abreviada y altamente modificada. En las flores podemos encontrar órganos dadores de núcleos (estambres) y/o órganos receptores de núcleos (ovario). En una sola flor pueden estar presentes uno (flores masculinas o femeninas) o los dos (flores hermafroditas).

El óvulo fecundado dará lugar a la semilla. Una propiedad importante de las semillas producidas mediante la fecundación es su variabilidad genética, cada semilla es genéticamente única debido a la redistribución del material genético de los padres (por entrecruzamiento entre los cromosomas) durante la formación de los gametos, seguido por una combinación aleatoria de los gametos masculinos y femeninos en la fertilización.

### 3.4. Adaptaciones ecológicas en las plantas

Teniendo en cuenta su reproducción y dispersión en el territorio, los organismos en Ecología se separan en dos tipos: r y K (Begon *et al.*, 2006). El concepto fue propuesto originalmente por MacArthur y Wilson (1967) y desarrollado posteriormente por Pianka (1970). La letra r se refiere a la ratio de incremento natural e indica que las especies con un alto valor de r son capaces de reproducirse rápidamente. Por lo tanto, los organismos que se engloban en este grupo tendrán una reproducción y desarrollo rápido y en general una vida corta. La letra K se refiere al tamaño de crecimiento de una población durante un tiempo prolongado y limitado por los recursos naturales (capacidad de carga). Las especies del tipo K tendrán un desarrollo prolongado y una vida larga, son poblaciones estables. Las especies que están incluidas en el tipo r presentan una complejidad morfológica reducida. *Arabidopsis*, y en general los sistemas modelo, son ejemplos de especies del tipo r (véase, tabla 4).

Las plantas de las especies tipo r producen grandes cantidades de semillas y tienen una forma sencilla, no presentan ninguna estructura que les permita ser distribuidas por medios específicos, tales como aire, agua o animales, en contraste con las semillas de plantas de tipo K. Las semillas tipo r permanecen cerca de su lugar de producción, cerca de la planta madre en donde germinan a lo largo del tiempo. En ocasiones, la germinación de las semillas de tipo K se basa, por el contrario, en una distribución espacial. A tal fin presentan estructuras en su cubierta que les permitan un transporte a distancias más largas.

La dispersión en el espacio puede ser abiótica (azoocoria) o biótica (zoocoria). La dispersión abiótica puede ser efectuada por el viento (anemocoria), el agua (hidrocoria) o por la misma planta madre (autocoria). En el caso de la anemocoria, las semillas pueden presentar estructuras que aumenten la resistencia al aire como pueden ser membranas laminares en forma de alas (*Acer samara*) o vilanos (Asteráceas). Algunas adaptaciones morfológicas pueden producir movimiento lateral directamente, pero la gran mayoría simplemente reducen la velocidad de caída, apoyándose en el viento para proporcionar el movimiento lateral (Augspurger, 1988).

La dispersión producida por los animales puede llevarse a cabo en el exterior de los animales (exozoocoria) para lo cual las semillas presentan adaptaciones morfológicas como por ejemplo ganchos que les permiten fijarse bien al pelo de los mamíferos o a las plumas de las aves. Por otra parte la dispersión por parte de los animales puede realizarse por transporte interno o endozoocoria si los animales comen el fruto o la semilla y luego la expulsan. Las semillas o frutos dispersados por vertebrados ofrecen alguna adaptación que llama la atención del animal como por ejemplo nutrientes ricos en azúcares, proteínas o grasas. Sin embargo los frutos dispersados por los pájaros suelen presentar colores brillantes (rojo, negro, azul e incluso combinaciones de estos).

Tipo r	Tipo K
Madura rápidamente.	Madura lentamente.
Ciclo de vida corto: la mayoría muere antes de reproducirse.	Ciclo de vida largo: baja mortalidad juvenil, compite bien por los recursos.
Tienen mucha descendencia – tienden a sobreproducir.	Poca descendencia a la vez.
Dedican poco tiempo a los cuidados de los hijos.	Dedican tiempo para los cuidados de los hijos.
La mayoría de las especies que producen plagas.	La mayoría de las especies en peligro de extinción
Población no regulada por la densidad: auge y caída de las cifras de población.	La población se estabiliza cerca de la capacidad de carga.
Oportunistas – invaden nuevas áreas.	Mantienen su número en ecosistemas estables.
Plantas de semillas pequeñas, simples y lisas.	Árboles con semillas grandes generalmente con sustancias de reserva o con adaptaciones para su traslado.
Alto potencial reproductivo.	Menor potencial de reproducción.
Organismos generalmente pequeños.	Organismos por lo general grandes.

Tabla 4.- Comparación entre las principales características de las dos adaptaciones ecológicas, r y K en plantas y animales. Adaptada de Begon *et al.* (2006).

En general, se encuentran más semillas sin dormición entre las plantas bianuales o perennes (tipo K), mientras que las semillas con dormición corresponden con mayor frecuencia a plantas anuales (tipo r; Baskin y Baskin, 2001). En términos generales, las semillas

morfológicamente más simples tienen una regulación de la germinación más compleja (Cervantes, 2008).

En su libro Ecología, Smith *et al.* (2007) dicen que el concepto de especie r y especie K es útil para comparar organismos del mismo grupo filogenético, y ponen como ejemplo dos salamandras del orden Caudata que habitan en la región occidental de Norteamérica (*Ambystoma maculatum*, salamandra moteada y *Plethodon cinereus*, salamandra de dorso encarnado). La salamandra moteada pone muchos huevos (hasta 250) y los abandona mientras que la salamandra de dorso encarnado solamente pone entre 4 y 10 huevos que cuida hasta que nacen las crías.

En plantas encontramos un ejemplo en la especie *Capparis spinosa*. Dividida en dos subespecies (*Rupestris* y *Spinosa*), de las cuales la subsp. *Rupestris* tiene características r como por ejemplo las semillas son más pequeñas, no presenta espinas, el porte es rastrero, puede autofecundarse. La subsp. *Spinosa* se aproxima más a características K (porte erecto, fecundación cruzada; ver tabla 5). El análisis de la forma de la semilla en estas subespecies puede aportar nuevos datos para entender la relación entre el ciclo vital (tipos r y K), y la diversificación vegetal.

	<i>Spinosa</i>	<i>Rupestris</i>
Porte	Erecto	Rastrero
Sistema radicular	Pivotante	Ramificado
Suelo	De roca madre a suelo profundo	Roca madre
Clima	Húmedo a semiárido	Húmedo a sahariano
Densidad de la población	Grande	Pequeño
Espinas	Desarrolladas	Ausentes o finas
Tamaño de la semilla	Grande	Pequeña
Número de estambres	Pequeño	Mayor y más elevado en el sur
Fecundación	Cruzada	Autofecundación

Tabla 5.-Características de las dos subespecies de *Capparis spinosa* (Saadaoui, 2012).



#### 4. Descripción morfológica de las semillas





#### 4.1. Semillas: definición, formación y estructura

La semilla es el óvulo fertilizado y maduro, pero el óvulo de las plantas no es una célula única y aislada como en animales. Los óvulos de las plantas son estructuras que contienen el gametofito femenino. Las partes que podemos diferenciar en un óvulo son funículo, calaza, tegumentos y nucela (figura 15).



Figura 15.- Partes de un óvulo.

El funículo es un tallo que une el resto del óvulo con la placenta del carpelo; una parte del funículo puede estar paralela a la nucela y se conoce como rafe. A través del funículo pasa el haz vascular.

La calaza es la región entre el final del funículo o el rafe y la nucela, desde aquí se inician el o los tegumentos.

La nucela es la célula a partir de la cual se desarrolla el megasporocito. La división de la nucela da lugar a dos células: una parietal, que al dividirse formará el tejido parietal y otra célula esporógena que será la célula madre de las megasporas o megasporocito; esta célula se divide por meiosis y forma 4 células haploides (megasporas). La nucela está en la zona central rodeada por uno o dos tegumentos. Los tegumentos circundan el cuerpo nucelar pero no llegan a unirse y dejan un poro o canal, el micrópilo, por el que pasara el tubo polínico. La región donde está el micrópilo se denomina región micropilar y la opuesta es la región calazal.

Una vez fecundado, el óvulo madura y los tejidos que lo formaban se transforman y se formará la semilla. La forma de la semilla vendrá determinada por todas las estructuras que formaban el óvulo.

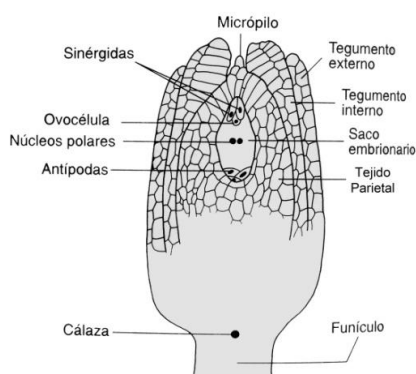


Figura 16.- Megasporocito.

La semilla es por lo tanto un órgano (¿u organismo?) complejo en el que encontramos tres genotipos diferentes: el materno, diploide, en los tejidos derivados de los tegumentos (cubierta seminal), calaza y tejido parietal (perispermo); el del embrión fecundado que es también diploide y es el resultado de la fusión de un gameto con la ovocélula y el genotipo triploide que resulta de la fusión de una célula del polen con los dos núcleos polares (Willemse y Went, 1984).

El desarrollo del óvulo provee de un número significativo de caracteres embriológicos utilizados en los estudios de Sistemática de plantas (Simpson, 2005). Hay varios tipos de óvulos que se clasifican según la inclinación del funículo con el eje principal del gametofito femenino y de los tegumentos durante el desarrollo:

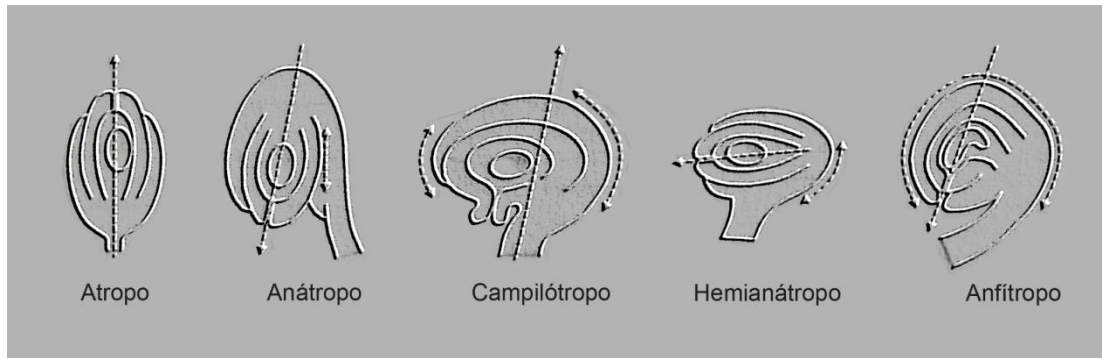


Figura 17.- Tipos de óvulos según Flores-Vindas (1999).

**Átropo u ortótropo.**- El eje de la nucela es el mismo que el del funículo. El micrópilo está en la posición opuesta a la base del funículo. En la madurez el hilum está en el extremo opuesto al micrópilo.

**Anátropo.**- No tiene inclinación en nucela y tegumentos. La inclinación se localiza a nivel del funículo; éste se desplaza hacia un lado, el micrópilo se desplaza a una posición adyacente a la base del funículo. Es el óvulo más común en Angiospermas. El eje de la nucela es casi paralelo al eje del funículo.

**Campilótropo.**- Existe crecimiento diferencial; el lado dorsal del óvulo crece más y el ventral se reduce. El eje funicular forma un ángulo aproximado de  $90^\circ$  con el eje principal de la nucela.

**Hemítropo o hemianátropo.**- no muestra inclinación en la nucela o los tegumentos pero el funículo se desplaza a un lado por crecimiento diferencial, en la parte en la que está el funículo el tegumento externo se acorta. El eje de la nucela es perpendicular al del funículo.

**Anfitropo.**- Hay un intenso crecimiento diferencial en los lados del rudimento seminal, del funículo y de la calaza.

El crecimiento diferencial de las distintas partes del óvulo (funículo, tegumento y nucela) es la causa de la diferente curvatura en los óvulos y posteriormente en las semillas. Dependiendo del tipo de óvulo y de las modificaciones que éste sufra a lo largo de su desarrollo la forma de la semilla cambiará, así Corner (1976) describe los tipos de semillas según el tipo de óvulo del que proceden. La mayoría de las modificaciones que sufre el óvulo durante su maduración afectan al funículo, la calaza o al rafe. Estas modificaciones van a tener como resultado distintos tipos de semillas.

## 4.2. Clasificaciones de las semillas

### 4.2.1. Clasificación de Corner

Corner (1976) clasifica las semillas según el tipo de óvulo del que proceden. Así entre las que derivan del tipo anátropo diferencia los siguientes tipos:

Semillas anátropas bitegumentadas normalmente son el producto de un alargamiento y diferenciación regular del óvulo, los tegumentos cubren toda la semilla excepto en la parte de la calaza. Normalmente el rafe y el antirafe tienen la misma longitud y los lados de las semillas son iguales; en algunos casos el alargamiento es desigual y se produce el desplazamiento de algunas partes, entonces la forma de la semilla será diferente a la del óvulo. Entre las variaciones de este tipo de semillas nos encontramos con semillas campilótropas (figura 18b), semillas obcampilótropas (figura 18a), semillas hiliares (figura 18c), semillas peri-calazales (figura 18g), semillas paqui-calazales (figura 18h), dependiendo como se desarrollen las distintas partes del óvulo.

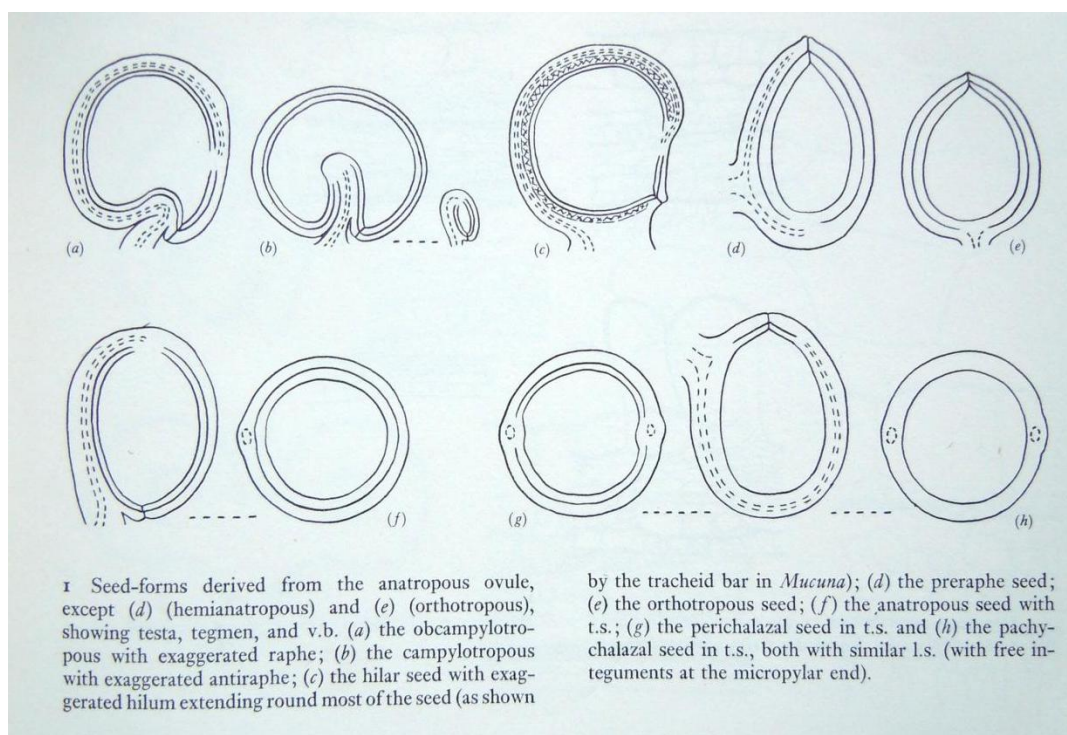


Figura 18.- Imagen obtenida del libro de E.J.H. Corner "The seeds of dicotyledons Vol. 2". En la leyenda, v.b. significa Haz vascular, l.s. sección longitudinal, t.s. sección transversal.

Además de las semillas anátropas Corner diferencia las semillas ortótropas, hemianátropas, aladas y pleurogramáticas (*pleurogrammatics*). Algunos ejemplos donde podemos encontrar estas semillas son:

Campilótroas.- *Psidium*, *Capparis* (figura 19a), *Crataeva* (Fam.- *Capparidaceae*). También se encuentran algunos ejemplos en las familias *Papaveraceae*, *Cactaceae*, *Leguminosae*.

Obcampilótroas.- *Bauhinia* (figura 19b) y *Barklya* (*Fabaceae*).

Hilares.- *Mucuna* (figura 19c), nos encontramos varios grados de desarrollo hilar en otros géneros de *Fabaceae* como *Canavalia* y *Erythrina*.

Perichalazales.- *Annonaceae* (figura 19d).

Pachychalazales.- *Lauraceae*, *Balsaminaceae*, *Rosaceae*, *Sapindaceae*, *Euphorbiaceae* (*Adelia*; figura 19e).

Hemianátropas o semillas Pre-rafe (figura 18d).- *Connaraceae* genero *Connarus* (figura 19f), en varias *Urticáceas* por ejemplo en la subfamilia *Conocephaloideae*, son intermedias entre las semillas anátropas (*Moraceae*) y las típicas ortótropas (*Urticaceae*).

Ortótropas (figura 18e).- *Urticaceae* (*Urtica*; figura 19 g), *Proteaceae*, *Flacourtiaceae*, *Piperaceae*, y *Polygonaceae*.

Por otra parte están las semillas aladas y pleurogramáticas, a las que no ha aplicado el mismo criterio de clasificación, ya que se basa en caracteres externos. Como se puede observar es una clasificación muy confusa, y no hay una distribución clara para las semillas que pertenecen a un mismo grupo filogenético.

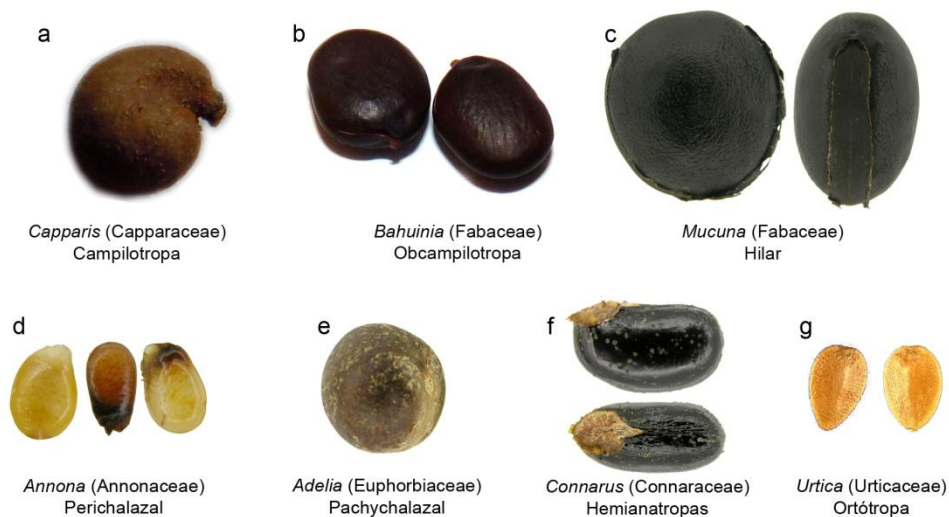


Figura 19.- Distintos tipos de semillas según la clasificación de Corner. Se indica el género (familia) tipo de semilla.

#### 4.2.2. Clasificación de Martin

La de Corner no es la única clasificación de las semillas. En la introducción de su artículo, Martin (1946) indica que en 150 años no se había hecho un esfuerzo sistemático para la clasificación desde que Joseph Gaertner a finales del siglo XVIII en su estudio *De fructibus et seminibus plantarum* dedicase un gran esfuerzo al estudio de los frutos y de la morfología de las semillas.

Martin (1946) propone una clasificación basada en los caracteres internos de la semilla, aunque como él mismo dice ésta presenta los mismos defectos que hemos comentado para los caracteres externos, aunque sí se consigue un mayor grado de coherencia en los grupos relacionados. Divide las semillas en doce tipos basándose en la posición del embrión en el saco embrionario (basal, periférica, axilar) el tamaño relativo del embrión con respecto a la semilla y la forma del embrión (figura 20).

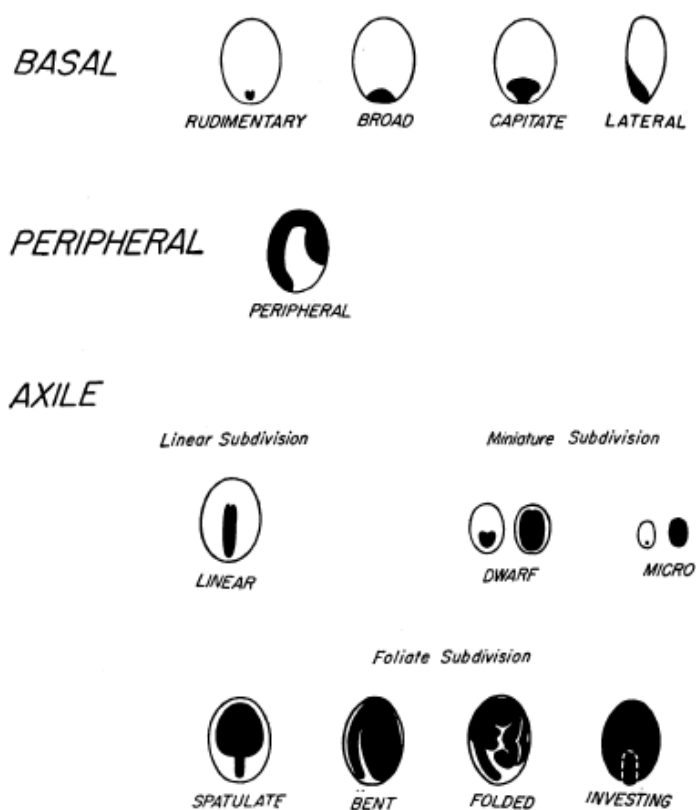


Fig. 2.—The twelve seed types exemplified in diagrams.

Figura 20.- Clasificación de las semillas según Martin.

Aunque ésta es la clasificación más comúnmente aceptada de las semillas hasta el momento (ver por ejemplo; Leubner-Metzger, 2005; Flores-Vindas, 1999 y Baskin y Baskin, 2001) no carece de serios inconvenientes; por ejemplo, la clasificación se hace sin tener en cuenta la morfología externa de la semilla, lo cual parece inapropiado.

En la siguiente tabla podemos ver un resumen de la clasificación de semillas de Martín (1946).

División / Subdivisión	Tipo de embrión	Familia representativa	Tamaño relativo		Aparición Filogenética		
			Semilla	Embrión			
Basal	Rudimentario	<i>Ranunculaceae</i>	Grande	Pequeño	M	D	
	Ancho	<i>Juncaceae</i>	Grande	Pequeño	M	D	
	Capitado	<i>Cyperaceae</i>	Grande	Pequeño	M		
	Lateral	<i>Poaceae</i>	Grande	Pequeño	M		
Periférica	Periférico	<i>Caryophyllaceae</i>	Grande	Grande			D
Axilar	L	Lineal	<i>Liliaceae</i>	Grande	Pequeño	G	M D
		Enano	<i>Ericaceae</i>	Pequeña	Pequeño		D
	Mini	Micro	<i>Orchidaceae</i>	Micro	Micro	M	D
		Espatulado	<i>Lamiaceae</i>	Grande	Grande	G	D
	Foliada	Doblado	<i>Fabaceae</i>	Grande	Grande		D
		Plegado	<i>Malvaceae</i>	Grande	Grande		D
		Invertido	<i>Rhamnaceae</i>	Grande	Grande		D

Tabla 6.- Clasificación de semillas según Martin, dentro de la división axilar encontramos tres subdivisiones (lineal, L; Miniatura, Mini; y Foliada). G.-Gimnospermas, M.- Monocotiledóneas, D.- Dicotiledóneas. Tabla adaptada de Baskin y Baskin (2001).

Dentro de la **división basal** se incluyen 4 tipos (rudimentario, ancho, capitado y lateral); son semillas de tamaño medio o grande con embriones pequeños y situados normalmente en la mitad inferior (excepto algunos casos del tipo lateral) y con abundante endospermo. Los tipos capitado y lateral se encuentran solo en Monocotiledóneas, mientras que los tipos rudimentario y ancho los podemos encontrar tanto en Monocotiledóneas como en Dicotiledóneas.



Tipo basal rudimentario.- Embrión pequeño, globular u oval-oblongo, y está rodeado por mucho endospermo. Este grupo no es del todo claro, ya que la mayoría de las familias que tienen semillas de este grupo tienen algunos géneros que pertenecen al tipo lineal y otros estarían dentro del tipo ancho.

Ejemplos: *Smilacaceae*; *Araliaceae*; *Aquifoliaceae*; *Magnolia* spp. (*Magnoliaceae*); *Anemone* spp. y *Trollius* spp. (*Ranunculaceae*); *Papaveraceae*.



Tipo basal ancho.- Embrión ancho, más ancho que alto, tanto el embrión como la semilla tienen forma globular, es común en Monocotiledóneas y Dicotiledóneas primitivas, parásitas, acuáticas o de zonas inundadas.

Ejemplos: *Nymphaea* spp. (*Nymphaeaceae*).



Tipo basal capitado.- Embrión expandido por arriba con forma de cabeza sólo en Monocotiledóneas.

Ejemplos: *Commelina* spp. (*Commelinaceae*).





Tipo basal lateral.- Embrión basal lateral o lateral, inclinado y expandido en el plano periférico, pequeño o mediano raramente grande. Este tipo se encuentra solo en gramíneas y tiene mucha diversidad el tamaño del embrión.

Ejemplos: *Triticum* spp. (*Poaceae*).



En la **división periférica** solamente hay un tipo, el tipo periférico. El embrión normalmente es alargado y grande, ocupa un cuarto de la semilla, parcialmente contiguo a la cubierta seminal y, a menudo, curvado. El endospermo es central y algunas veces lateral. Los cotiledones son estrechos o expandidos. Este tipo de semillas las encontramos en Dicotiledóneas aunque en algunos casos uno de los cotiledones es de menor tamaño (anisocotilia).

Ejemplos: *Beta vulgaris*, *Chenopodium album*, (*Chenopodiaceae*); *Aizoaceae*; *Portulacaceae*; *Cactaceae*; *Frankeniaceae*; *Sclerantaceae*; *Polygonaceae*.

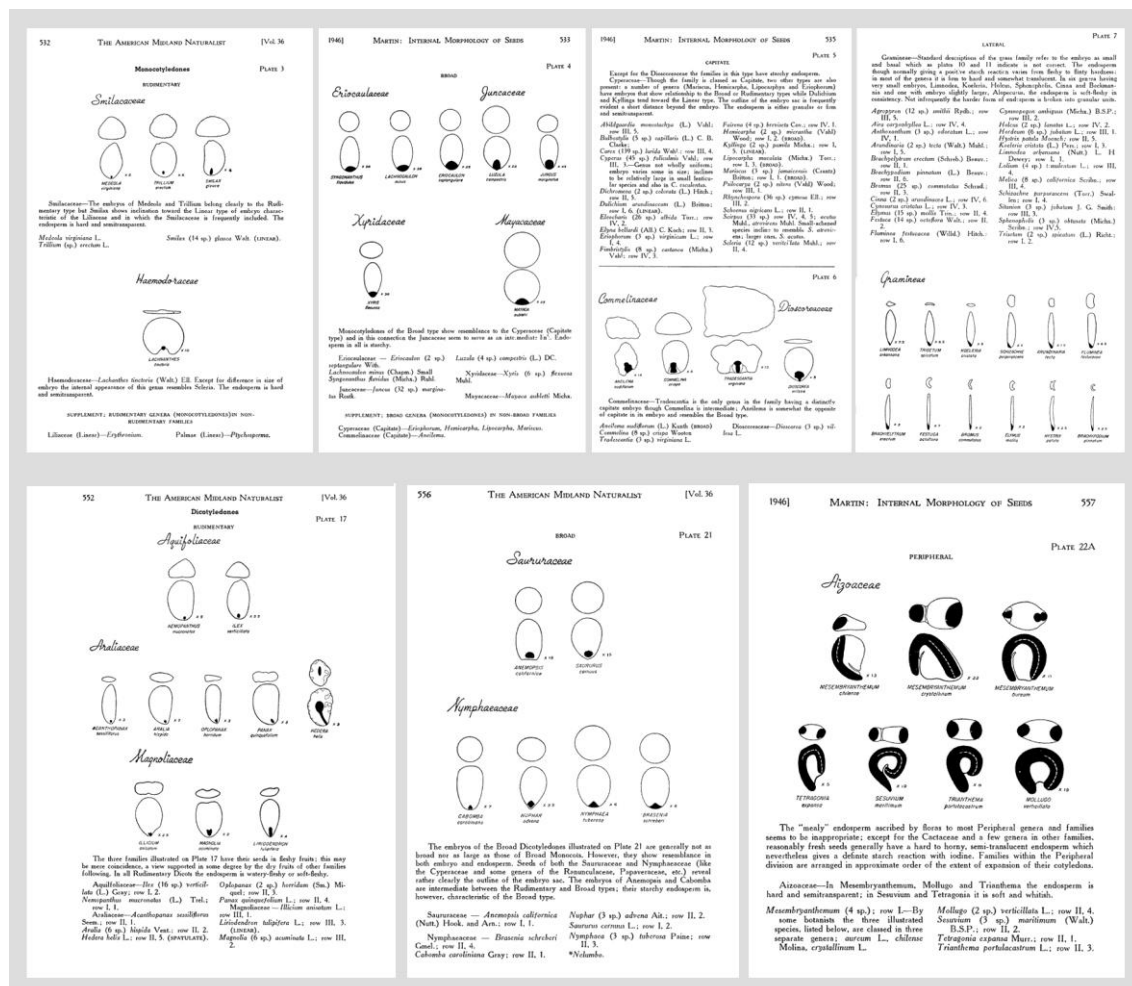


Figura 21.- Páginas extraídas del artículo de Martin (1946) en las que representa en un corte transversal y en un corte longitudinal la posición y forma del embrión dentro de la semilla en distintos géneros. Las cuatro páginas superiores muestran los 4 tipos de embrión en la división basal en Monocotiledóneas, en las páginas inferiores vemos semillas de Dicotiledóneas con embrión rudimentario, semillas con embrión ancho y semillas de la división periférica (embrión periférico).

La tercera división que hace es la **división axilar**. Dentro de esta división incluye tres subdivisiones (lineal, foliada y miniatura) y siete tipos distintos. El embrión es central (axilar). Tanto el tamaño de la semilla como el tamaño relativo del embrión es muy variable.

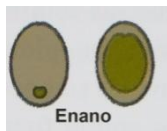
#### Subdivisión lineal



Tipo lineal.- El embrión es varias veces más largo que ancho; normalmente recto aunque en ocasiones puede ser espiralado o curvado. Los cotiledones son muy pequeños no expandidos o no desarrollados. Las semillas normalmente no son enanas (excepto en la familia *Burmanniaceae*). Este tipo lo podemos encontrar en los tres grupos (Gimnospermas, Monocotiledóneas y Dicotiledóneas).

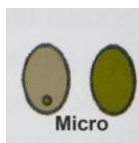
Ejemplos: en Gimnospermas *Pinus* spp. (*Pinaceae*); en Monocotiledóneas *Allium* spp. (*Alliaceae*); *Iris* spp. (*Iridaceae*); en Dicotiledóneas *Apium graveolens* y *Daucus carota* (*Apiaceae*); *Nicotiana* spp., *Petunia hybrida*, *Capsicum annuum* y *Lycopersicon esculentum* (*Solanaceae*).

Subdivisión miniatura.- Las semillas son pequeñas o diminutas. Baskin y Baskin (2007) hacen una revisión de la clasificación de semillas de Martin y proponen modificar la división miniatura. En esta revisión el tipo enano ha sido suprimido debido a su limitado valor biológico y las semillas que se incluían en este grupo se incluirán en otros grupos independientemente de su tamaño. El tipo micro se reemplaza por el tipo indiferenciado, para reflejar el estado del embrión en semillas frescas ya que carece de órganos.



Tipo enano.- Semillas de 0,2 a 2 mm de longitud, el tamaño relativo de los embriones varía de pequeño a total, generalmente robustos, y su forma puede ser oval, elíptica u oblongo.

Ejemplos: *Drosera angelica* (*Droseraceae*); *Campanula americana* (*Campanulaceae*); *Begonia* spp. (*Begoniaceae*); *Saxifragaceae*; *Ericaceae*; *Gentianaceae*.



Tipo micro.- Tamaño de las semillas es inferior de 0,2 mm. al igual que en el tipo enano el tamaño relativo de los embriones varía de pequeño a total.

Ejemplos: Especies de *Orchidaceae* y de *Burmanniaceae*.

Subdivisión foliada.- Las semillas generalmente son medianas o grandes, el tamaño relativo del embrión es grande, ocupa desde un cuarto al total de la semilla. En esta subdivisión encontramos cuatro tipos.



Tipo espatulado.- Embrión recto. Los cotiledones son variables de delgados a gruesos y ligeramente expandidos a muy expandidos.

Ejemplos: *Ephedra* spp. (*Ephedraceae*); *Fraxinus excelsior* y *Syringa* spp. (*Oleaceae*); *Lactuca sativa* y *Helianthus annuus* (*Asteraceae*); *Vitis* spp. (*Vitaceae*); *Ricinus communis* (*Euphorbiaceae*); *Cucumis* spp. (*Cucurbitaceae*).



Tipo doblado.- Espatulado pero doblado sobre el hipocótilo en forma de navaja. Los cotiledones son generalmente gruesos.



Ejemplos: *Rhus* spp. (*Anacardiaceae*); *Trifolium* spp., *Melilotus alba*, *Glycine max* y *Pisum sativum* (*Fabaceae*); *Lepidium* spp., *Arabidopsis* spp., y *Brassica* spp. (*Brassicaceae*).

Tipo plegado.- Cotiledones normalmente delgados, expandidos y plegados de distintas formas.



Ejemplos: La mayoría de las especies de *Acer* (*Sapindaceae*); *Geranium* spp. y *Pelargonium* spp. (*Geraniaceae*); *Malva rotundifolia* (*Malvaceae*).

Tipo invertido (*invert*).- Los cotiledones son gruesos, superpuestos que encierran el hipocótilo que es pequeño. Endospermo muy reducido o ausente.



Ejemplos: *Fagus sylvatica* (*Fagaceae*); *Ceanothus* spp. (*Rhamnaceae*).

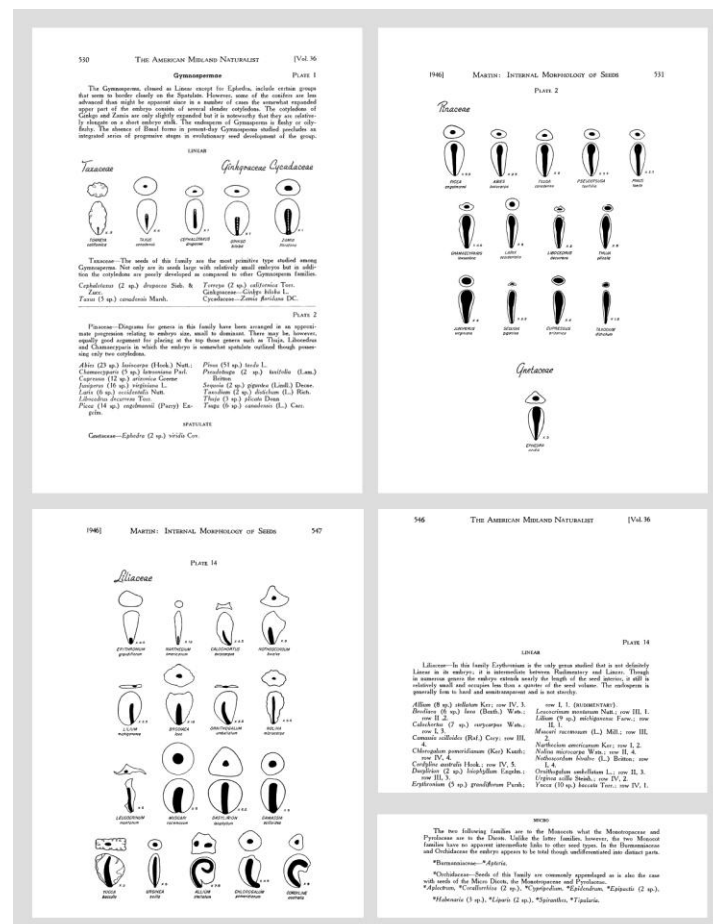


Figura 22.- División axilar en Gimnospermas y Monocotiledóneas según Martin. Arriba las páginas con los embriones tipo lineal y espatulado en Gimnospermas. Debajo el tipo lineal en Monocotiledóneas y la página donde explica la familia *Liliaceae* y el tipo de embrión micro de la familia *Orchidaceae*, para este no hay imágenes de las semillas.

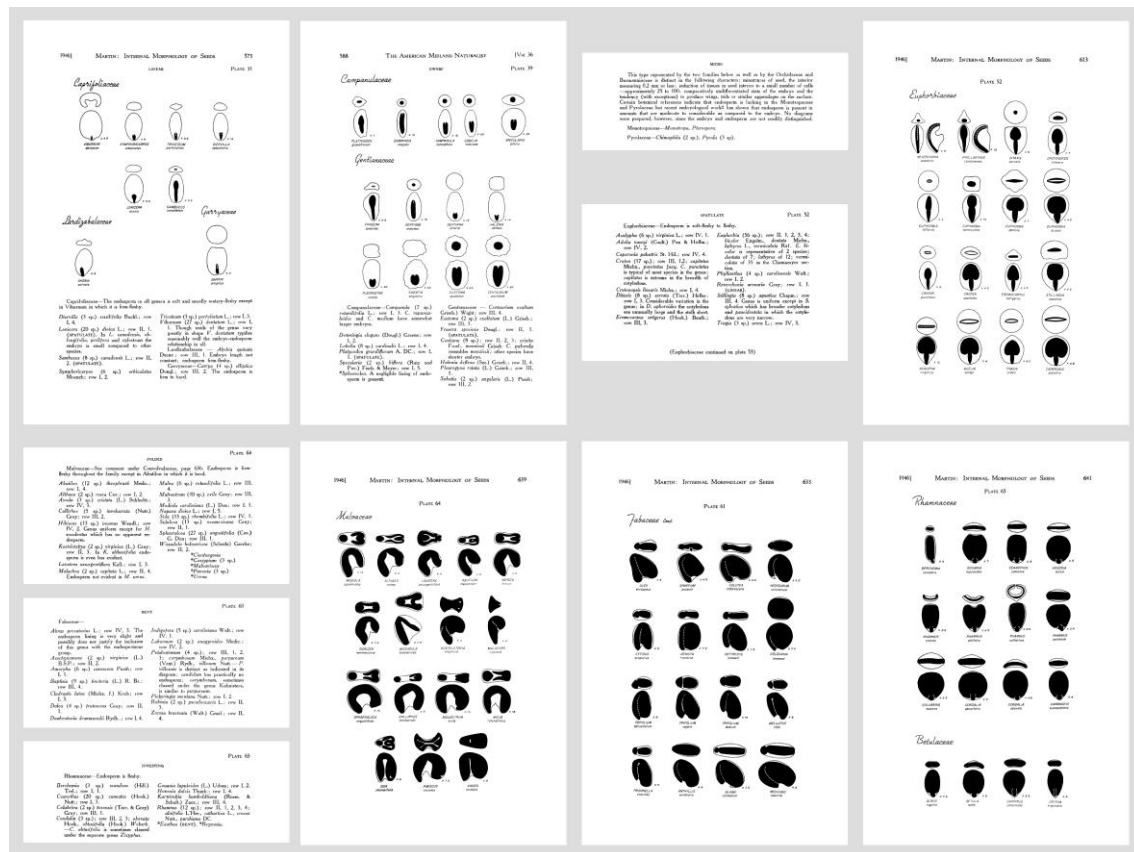


Figura 23.- División axilar en Dicotiledóneas según Martin.

#### 4.2.3. Otras clasificaciones

Además de las clasificaciones vistas anteriormente encontramos que muchos autores a la hora de clasificar las semillas analizadas en su trabajo suelen utilizar el tamaño y la forma de manera poco precisa.

En el libro *Fossil plants of the London Clay* (Collinson, 1983) encontramos una clasificación para los fósiles del bajo Eoceno en la zona de London Clay en la cual las semillas aparecen distribuidas en varios grupos.

Grupo A: frutos y semillas pequeños de menos de 10 mm que pueden tener forma de lágrima (1), riñón (2), herradura (3), barco (4) o de banana (5).

Grupo B: frutos y semillas aplanados con simetría bilateral y forma distinta al grupo A (6).

Grupo D: frutos y semillas con forma globosa, esférica, cónica u ovoide con estructuras longitudinales que se extienden en toda su longitud de 1 a 10 (raramente 16), que lo dividen en un número de partes iguales, lóbulos o segmentos. Estas estructuras longitudinales pueden ser: crestas, surcos, ángulos, bandas de fibra estrechas o anchas (7).

Grupo G: frutos y semillas de forma variada que no tengan caracteres de los grupos anteriores. Este grupo incluye los siguientes tipos: comprimidos (con muescas, hendiduras o arrugados), con pequeños agujeros (8), con bandas de fibra anastomosadas (9), parcialmente lisos (suaves), rasgos aislados en la superficie (10).

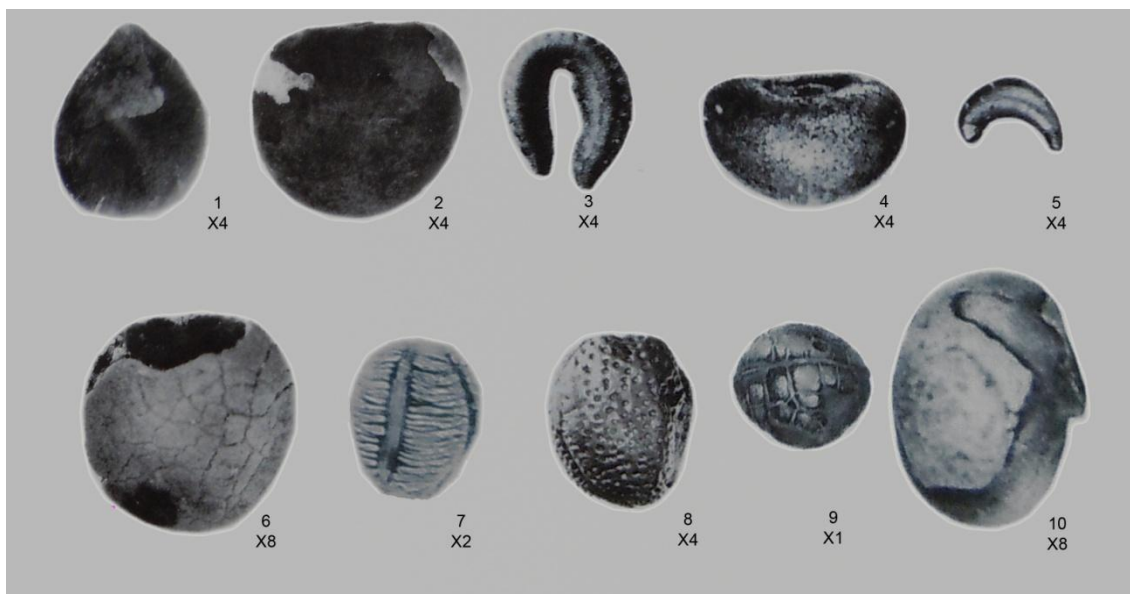


Figura 24.- Semillas fósiles del bajo eoceno (Collinson, 1983). Los números se corresponden con los tipos descritos en el texto.

Otras veces las semillas se clasifican según el lugar en el que almacenen las sustancias de reserva para el momento de la germinación. Si las sustancias de reserva están almacenadas en el endospermo se denominan semillas endospermicas o albuminosas; si están en el perispermo, perispémicas; cotiledospermas si están en los cotiledones, hipocotilospermas o macropodiales si tienen un hipocótilo carnoso, y calazospémicas si los nutrientes están en el tejido calazal (Flores-Vindas, 1999).

#### 4.3. Variaciones en forma y tamaño en las semillas: Interpretación de las clasificaciones anteriores

##### 4.3.1. Variación en el tamaño de las semillas

El tamaño de las semillas es muy variable y depende de varios factores. En primer lugar, tiene relación con el grupo taxonómico. Semillas de una misma especie tienen tamaños parecidos, pero no se puede decir siempre lo mismo a nivel de familia, encontrándose familias con un tamaño muy regular y otras con grandes variaciones.

La familia *Orchidaceae* tiene por lo general semillas muy pequeñas, incluso microscópicas. Por el contrario, las especies de leguminosas se caracterizan por una gran variación que incluye desde semillas pequeñas como las de *Lotus japonicus* (1-2 mm.) hasta semillas grandes como las de *Phaseolus* o *Vicia* y algunas gigantes (7–8 cm) en el árbol de frijol negro de Australia (*Castanospermum australe*) o en *Mora oleífera* en la que cada semilla pesa más de 1000 gr. (Flores-Vindas, 1999).



Figura 25.- Semillas de distintas leguminosas (a) *Lotus japonicus* (1mm) (b) *Castanospermum australe* (7-8 cm) (c) *Mora oleífera* (hasta 18 cm).

En la clasificación de Martín las familias no siempre están bien adscritas a grupos. La familia *Orchidaceae* y la familia *Burmanniaceae* sí están adscritas al tipo micro y no se mencionan géneros de estas familias que pertenezcan a otro tipo. Muchas de las familias se adscriben a un tipo de semillas al que pertenecen la mayoría de los géneros por él estudiados, pero contienen algún género que no está dentro de este tipo. Por ejemplo en la familia *Brassicaceae* la mayoría de los géneros pertenecen al tipo doblado excepto *Brassica* y *Raphanus* que pertenecen al tipo plegado (ambos tipos están incluidos en la misma subdivisión). Las semillas de la familia *Capparidaceae* son del tipo periférico. Algunas clasificaciones de plantas incluyen a las *Capparidaceae* dentro de la familia *Brassicaceae*; en este caso, la diferencia sería mayor pues las semillas de *Capparidaceae* pertenecen a la división periférica mientras que las de *Brassicaceae* están en la división axilar.

La familia *Saxifragaceae* en general se adscribe al tipo enano, pero su género *Philadelphus* pertenece al tipo lineal y el género *Fendlera* al tipo espatulado. Por otra parte hay familias que no pertenecen al tipo enano en las que podemos encontrar géneros que si están incluidos en este tipo. Así ocurre en los casos de *Eriodictyon*, *Hydrolea* y *Nama* (*Hydrophyllaceae*; espatulado), *Navarretia* (*Polemoniaceae*; espatulado), *Dodecatheon* y *Primula* (*Primulaceae*; lineal), *Guettarda*, *Houstonia*, *Oldenlandia*, *Pentodon* (*Rubiaceae*; espatulado). *Nicotiana*, *Petunia* (*Solanaceae*; lineal).

Para Martín, en las plantas, hay dos tendencias generales a la hora de producir semillas a las que se refiere como “cantidad” y “calidad”. En la tendencia a la que se refiere como “cantidad” estarían aquellas especies que producen muchas semillas, en general de tamaño pequeño y embriones poco desarrollados. Las plantas con tendencia a producir semillas de

“calidad” son aquellas que producen un número menor de semillas, de tamaño más grande y embriones bien desarrollados.

En la clasificación de Martin (1946), la división axilar contiene entre otras las subdivisiones miniatura y foliada. La subdivisión miniatura, como todas las semillas producidas según la tendencia “cantidad” pertenece al tipo r. En la subdivisión foliada encontramos semillas características del tipo de “calidad”: un embrión grande con cotiledones bien desarrollados y, en general, las semillas también son grandes constituyendo ejemplos del tipo K. Ambos tipos de semillas, foliada y miniatura (tipo K y tipo r), se encuentran frecuentemente en el reino vegetal y pueden manifestarse dentro de una misma familia como ocurre en las *Rubiaceae*, *Ericaceae*, *Saxifragaceae* e *Hydrophyllaceae* (Martin, 1946). La forma Miniatura de las semillas se produce comúnmente en cápsulas de plantas anuales (*Orchidaceae*, *Campanulaceae*) y la foliada en aquenios y frutos carnosos de plantas perennes (*Lauraceae*, *Aceraceae*).

El tamaño de la semilla muestra algunos patrones llamativos que en la actualidad siguen sin explicación. En general hay una relación inversa entre el tamaño de la semilla y la latitud. La masa promedio de las semillas disminuye unas 300 veces desde el Ecuador hasta los 60° de latitud, aproximadamente a la altura de la población de Bergen en Noruega (Moles *et al.*, 2007). La media en la masa de las semillas aumenta diez veces por cada 23 grados hacia el Ecuador, una tendencia que parece ser independiente de la forma de crecimiento, de la productividad primaria neta, de la depredación de las semillas y de la producción (Moles y Westoby, 2003). En este estudio Moles y Westoby recopilan datos del tamaño de las semillas en distintas latitudes y ven que, de 79 especies, en 36 de ellas el tamaño aumenta al desplazarse hacia el Ecuador y solamente en dos disminuye.

El tamaño de las semillas muestra una gran variación tanto dentro de una población como en respuesta a las condiciones ambientales. Puede variar en una misma planta, dentro de inflorescencias e incluso dentro de un mismo fruto (Fenner, 1992). Por ejemplo, en una población de *Cytisus striatus* encontramos una relación entre el tamaño de la semilla y la edad de la planta, siendo las semillas mayores cuanto más avanzada era ésta (datos no publicados).

Otro ejemplo lo vemos en Wulff (1986), quien describió que el tamaño de las semillas en una población de *Desmodium paniculatum* variaba en un factor de cuatro y en una misma planta en un factor de dos. El tamaño de las semillas también es menor si estas se han desarrollado en condiciones de sequía, falta de luz o escasez de nutrientes.

#### 4.3.2. Variación en la forma de las semillas

Las clasificaciones vistas en el apartado anterior están basadas en la morfología que presentan las semillas dependiendo del tamaño relativo del embrión y su disposición dentro de la semilla. También se utiliza el tamaño de la semilla (Martin, 1946). La clasificación de Corner (1976) utiliza el tipo de óvulo así como alguna estructura de la testa (semillas aladas o pleurogramáticas).

En ocasiones, al hablar de la morfología de las semillas, se trata de otras magnitudes como longitud, anchura, superficie, sin mencionar modelos geométricos; ver por ejemplo, Collinson (1983), Li *et al.* (1999), Muñoz *et al.* (2001). Los modernos métodos de análisis de imagen permiten obtener rápidamente estas dimensiones. Así, la mayoría de los trabajos modernos de morfometría aplicada a semillas se basan en estas aproximaciones (Grillo *et al.*, 2010; Researchgate, 2011) pero, al carecer de la comparación con un modelo geométrico, falta una información importante en la descripción.

#### 4.4. Modelos geométricos para el análisis de la forma de semillas

La mayoría de estudios sobre la morfología de semillas describen su color, sus dimensiones y en algunos casos hacen referencia a su forma, en general indicando de manera aproximada un objeto geométrico de referencia (óvalo, ovoide, esfera, ...). A la hora de describir su forma nos encontramos con semillas ovaladas, ovoides, esféricas, elípticas, lenticulares, aladas, reniformes, triangulares, con forma de lágrima, de corazón, ...

Por ejemplo, Zoric *et al.* (2010) analizan las semillas de 38 especies de *Trifolium*. Para clasificarlas, entre otras características utilizan el peso, las dimensiones, el color, la textura de la testa y la forma. Cuando hablan de la forma de las semillas se refieren a ella como: redonda, ovoide, ovoide alargada y en forma de corazón.

Leython y Jáuregui (2008) analizan cuatro especies del género *Caliandra*. Al referirse a la forma de las semillas la describen como ovalada, anchamente ovalada, orbicular y elíptica.

Pocos son los estudios en que se ha utilizado un modelo geométrico para describir una semilla determinada de una forma precisa y comparar entre diferentes genotipos (variedades, mutantes) o situaciones fisiológicas, ver por ejemplo Robert *et al.* (2008) o Keefe y Davis (2010).

Robert *et al.* (2008) comparan la forma de la semilla de *Arabidopsis thaliana* con un esferoide prolato (sólido generado por la revolución de una elipse en torno a su eje mayor). Para ello se toman dos medidas independientes del área de las semillas una en su vista ortogonal plana y la otra en su vista apical. La vista ortogonal plana de la semilla se compara con una elipse y la vista apical con un círculo. Para confirmar que la vista longitudinal de la

semilla se parece a una elipse, se compara el área en su vista ortogonal plana (obtenida mediante un programa de análisis de imagen) con el área que le correspondería a una elipse que tuviese los diámetros de la semilla. Por otra parte se calcula el índice de circularidad de la vista apical de la semilla para ver su parecido con el círculo. Se deduce que las semillas de *Arabidopsis* se ajustan bien a la forma de una elipse. Con este método se puede ver si el área de la semilla presenta o no diferencias con el área de la elipse, y comparar entre diferentes genotipos o tratamientos pero conviene, para posteriores aplicaciones, que el ajuste sea óptimo y a tal fin se ha conseguido mayor aproximación mediante el modelo basado en una curva cardioide.

Keefe y Davis (2010) ajustan la forma de las semillas de coníferas a la de un elipsoide. Para lograr un buen ajuste utilizan varios elipsoides para cada semilla. La forma de las semillas se estima como la suma de  $2^j$  elipsoides parciales fusionados en su ecuador, (los valores de  $j$  están comprendidos entre 0 y 3), y así comparan la forma de las semillas dentro de una misma especie o entre especies variando el número de elipsoides utilizados en el ajuste.





## OBJETIVOS

---



Primer objetivo: Descripción geométrica de la forma de semillas en especies modelo: *Arabidopsis*, *Lotus*, *Medicago*.

Segundo objetivo: Aplicaciones del método para la comparación entre semillas:

1. Entre variedades de las especies modelo (Columbia y Wassilewskija en *Arabidopsis*; Gifu y Miya en *Lotus*).
2. Entre mutantes en dichas especies.  
Para *Arabidopsis thaliana* se analizan los mutantes en la ruta del etileno *eto1-1* (sobreproduce etileno), *etr1-1* (insensible al etileno), *ctr1-1* (triple respuesta constitutiva), *ein2-1* (Insensible al etileno), triple mutante (*ein2-1*, *etr1-7* y *ers1-2*) y los mutantes implicados en la síntesis de celulosa *kor1-1* (Wassilewskija) y *e-112* (Columbia).
3. Para *Lotus japonicus* los mutantes utilizados son: en el fondo genético Gifu, *Ljetr1-1* (ruta del etileno) y *Ljhar1-1* (regulación sistémica de la nodulación) y en el fondo genético de la variedad MG-20, *enigma1* (insensible al etileno) y *beyma* (insensible al ácido abscísico).
4. Aplicación del método basado en una cardioide al estudio del cambio en la forma durante la germinación. Aplicación de análisis de regresión.
5. Entre semillas de *Capparis spinosa* pertenecientes a dos subespecies: *Rupestris* y *Spinosa* recogidas en distintas áreas geográficas de Túnez.



## MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. Material vegetal

Se han utilizado semillas de plantas pertenecientes a la familia *Brassicaceae* o *Cruciferae* (*Arabidopsis thaliana*, 1.1), a la familia *Capparidaceae* (*Capparis spinosa*, 1.2), la familia *Capparidaceae* en algunas clasificaciones se incluye dentro de la familia *Brassicaceae*. También se utilizan semillas de la familia *Leguminoseae* o *Fabaceae* (*Lotus japonicus*, 1.3; *Medicago truncatula*, 1.4).

### 1.1. *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* es la planta modelo; esta planta se utiliza en investigación en laboratorio desde hace más de 40 años (*Multinacional Arabidopsis Steering Committee*, 2001). Produce semillas pequeñas con una longitud aproximada de 0,5 mm, el área de estas semillas estimada a partir de las imágenes fotográficas varía entre 0,10 y 0,17 mm<sup>2</sup> (figura 26).



Figura 26.- *Arabidopsis thaliana* en invernadero. Planta, flor, fruto y semilla.

Las semillas estudiadas en estos experimentos pertenecen a los ecotipos Columbia (Col-0) y Wassilewskija (Ws). El ecotipo Col-0 procede de la localidad de Columbia (38° N, 92°W; USA), el ecotipo Ws procede de Wassilewskija (52° N, 30° E; Rusia).

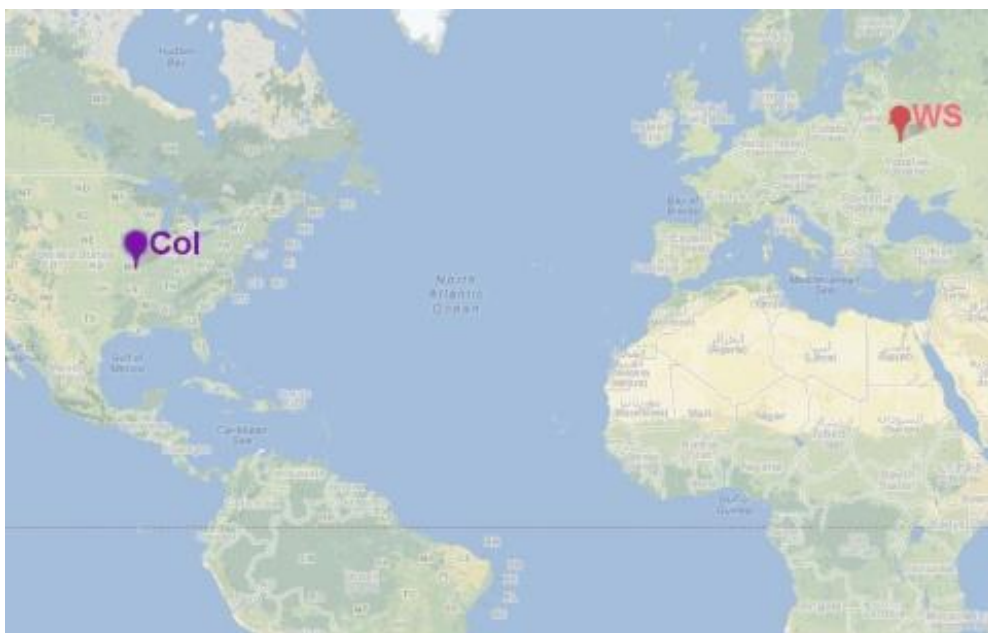


Figura 27.- Localización de los dos ecotipos de *Arabidopsis* utilizados para este trabajo.

En este trabajo se exponen los resultados relativos a cuatro experimentos distintos realizados con *Arabidopsis*. Las semillas de Columbia y mutantes en la ruta del etileno, utilizadas en los 3 primeros experimentos, pertenecen a lotes obtenidos en distintos años en el invernadero del IRNASA.

Para el primer experimento las 125 semillas utilizadas pertenecían a distintos lotes (25 semillas por lote):

Columbia: 2001, 2002, 2005, 2006 y 2007.

*ctr1-1*: 2001, 2002, 2004, 2005 y 2006.

*eto1-1*: 2000, 2001, 2002, 2003 y 2006.

*etr1-1*: 2001, 2002, 2004, 2005 y 2006.

Triple mutante: 2000, 2003, 2004-1, 2004-2 y 2006.

Para el segundo experimento se analizaron 20 semillas que pertenecían a los genotipos: Columbia (semillas del año 2005), triple mutante (semillas del año 2006) y *ein2-1* (semillas obtenidas el año 2005).

En el tercer experimento las semillas analizadas fueron: Columbia 20 semillas lote 2007, Triple mutante 10 semillas del lote 2006, *ctr1-1* 20 semillas lote 2006, *etr1-1* 10 semillas lote 2006, *eto1-1* 2006 20 semillas para el análisis de semillas secas y 10 para imbibición y *ein2-1* 20 semillas del año 2005.



En el cuarto experimento el estudio de la variación de la forma durante la imbibición, las semillas utilizadas, tanto las de los mutantes *kor1-1* y *e-112* como las de los controles utilizados en los experimentos (Columbia y Wassilewskija) se obtuvieron del INRA-Versailles. Se analizaron siete semillas de cada genotipo.

Las variedades utilizadas de *Arabidopsis thaliana* son Columbia (Col) y Wassilewskija (Ws). Los mutantes son:

- *eto1-1*, *Ethylene Overproducer*: línea del banco NASC de Nottingham (stock N237). Fondo genético Columbia (mutación recesiva; mutagénesis con EMS (Kieber *et al.*, 1993).
- *etr1-1*, *Ethylene Insensitive Response*: línea del banco ABRC de Ohio, USA (stock CS8086). Fondo genético Columbia (mutación dominante; mutagénesis con diepoxibutano (Bleecker *et al.*, 1988).
- *ctr1-1*, *Constitutive Triple Response*, obtenido mediante mutagénesis con EMS. Mutación recesiva que confiere un fenotipo de triple respuesta, igual al presentado por las plantas que crecen en presencia de etileno, caracterizado por: crecimiento radical inhibido, engrosamiento del hipocótilo y curvatura exagerada del gancho apical. (Kieber *et al.*, 1993).
- *ein2-1*, *Ethylene Insensitive*. Fondo genético Columbia, mutagenizado con 0,4% de EMS (Guzman y Ecker, 1990). Donación de Brad Binder (Tennessee, USA).
- Triple mutante (*ein2-1*, *etr1-7* y *ers1-2* (*Ethylene Response Sensor*)). Fondo genético Columbia. El doble mutante *etr1-7*, *ers1-2* obtenido por cruzamientos. El mutante homocigótico *ers1-2* fue cruzado con *etr1-6*, *etr1-7* y *ers2-3* para obtener dobles mutantes (Hua y Meyerowitz, 1998). Los dobles mutantes fueron cruzados con el mutante *ein2-1* (Hall y Bleecker, 2003). Donación de Brad Binder.
- *e-112* es un mutante de Columbia en el locus PROCUSTE1 (PCR1) codifica para (CesA6), subunidad catalítica 6 [formadora de UDP] de la celulosa sintasa A que confiere resistencia a isoxaben. Existen al menos otras nueve subunidades en *Arabidopsis* (Fagard *et al.*, 2000; Desprez *et al.*, 2002). Los mutantes *CesA6* presentan defectos en la celulosa de las paredes celulares primarias. Donación de Samantha Vernhettes (INRA-Versailles).

- *kor1-1* es un mutante de la variedad Wassilewskija en el gen KORRIGAN, que codifica la proteína (KOR) una endo-1,4-beta-glucanasa con un dominio transmembrana y dos señales polarizadas en la cola citosólica que tienen un papel crítico durante la citocinesis (Szyjanowicz *et al.*, 2004). KOR actúa probablemente en la interfase membrana-pared celular, ensamblando la red de celulosa-hemicelulosa en la pared celular en expansión (Nicol *et al.*, 1998). Las plantas mutantes *Kor1-1* son enanas (Zuo *et al.*, 2000) y tienen una deficiencia severa de celulosa y en la elongación celular (Nicol *et al.*, 1998). Donación de Samantha Vernhettes (INRA-Versailles).

## 1.2. *Capparis spinosa*

El género *Capparis* comprende más de 250 especies repartidas por el mundo entero (Jacobs, 1965; Barbera, 1991). *Capparis spinosa* (figura 28) es un arbusto tupido de hoja caducifolia y de origen tropical (Fici, 2001) que, en la región mediterránea se divide en dos subespecies: *Spinosa* y *Rupestris* (syn. *Inermis*; Higton y Akeroyd, 1991). Hay varios autores que han descrito las dos subespecies de *Capparis* (Heywood, 1993; Tutin *et al.*, 1993; Fici y Gianguzzi, 1997; Saadaoui, 2012).

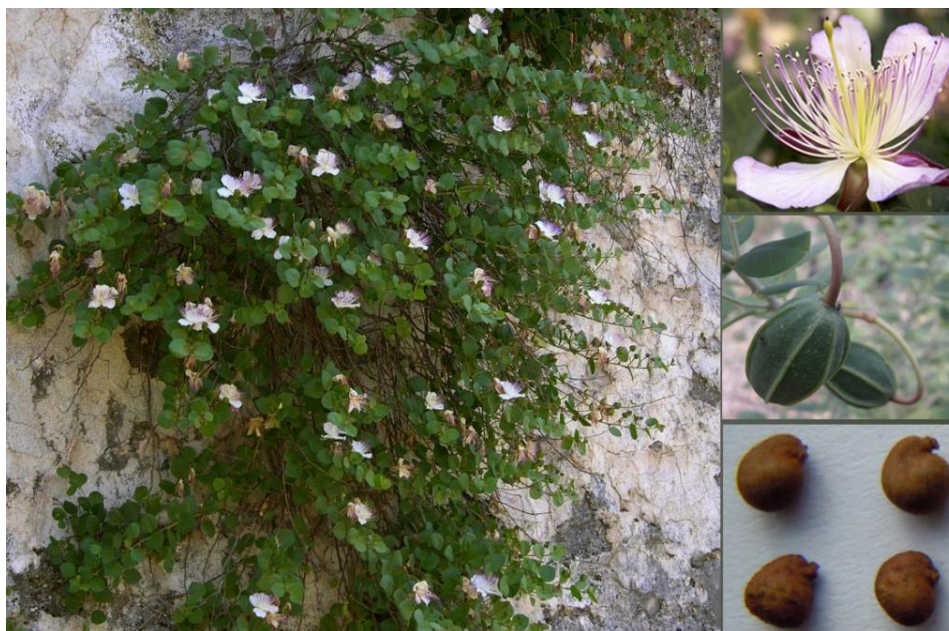


Figura 28.- *Capparis spinosa*. Planta, flor, fruto y semilla. La fotografía de las semillas se tomo en el laboratorio.

En Túnez, *Capparis* está distribuida por todo el país y se encuentran plantas de las dos subespecies (figura 29, tabla 7).

Las semillas de *Capparis spinosa* fueron recogidas en distintas regiones geográficas de Túnez por Ezzeddinne Saadaoui (Ministerio de Agricultura, Instituto National de investigación en ingeniería rural, aguas y bosques; (INRGREF); Université de Carthage). El área estimada a partir de las imágenes fotográficas varía entre 5,9 y 9,8 mm<sup>2</sup>, dependiendo de la localidad en que fueron recogidas y de la subespecie.

Se analizan semillas de las dos subespecies que se han clasificado en 10 grupos según la población en la que fueron recogidas (figura 29, tabla 7).



*Capparis spinosa* subsp. *Rupestris*:

1. Ghomarassen (GHO)
2. Chenini-Tataouine (CHT)
3. Oued Zayied (OZ)
4. Houmana (HOU)
5. Ghar el Melh (GEM)

*Capparis spinosa* subsp. *Spinosa*:

6. Chouigui (CHO)
7. Joumine (Jou)
8. Bullaregia (Bul)
9. Chemtou (CHE)
10. Lafareg (Beja)

Figura 29.- Mapa de Túnez con la localización geográfica de las plantas. En azul las localidades donde se recogieron las plantas de la subespecie *Rupestris* y en rojo la subespecie *Spinosa*.

Subespecie	Población	Clima	Latitud (N)	Longitud (E)	Altitud (m)	pH del Suelo	Total calcáreo (%)	Composición del suelo
<i>C. spinosa</i> subsp. <i>Rupestris</i>	Ghomrassen	árido	33°06'	10°18'	326	8.6	23	afloramientos rocosos
	Chenini-Tataouine	sahariano	33°42'	9°23'	211	8.1	45	afloramientos rocosos
	Oued Zayied	árido	34°08'	9°31'	180	7.6	56	afloramientos rocosos
	Houmana	sub-húmedo	36°40'	9°08'	371	7.2	11	afloramientos rocosos
	Ghar El Melh	sub-húmedo	37°10'	10°11'	5	7.9	71	afloramientos rocosos
<i>C. spinosa</i> subsp. <i>Spinosa</i>	Chouigui	semi-árido	36°53'	9°46'	158	7.5	38	afloramientos rocosos
	Joumine	sub-húmedo	36°57'	9°31'	106	7.8	38	calcáreo
	Bullaregia	sub-húmedo	36°33'	8°44'	204	8.1	61	calcáreo -arenosa
	Chemtou	sub-húmedo	36°29'	8°44'	189	7.7	31	calcáreo -arenosa
	Lafareg	sub-húmedo	36°28'	8°33'	171	7.4	45	calcáreo -arenosa

Tabla 7. Características ecológicas básicas de las poblaciones estudiadas.

### 1.3. *Lotus japonicus*

*Lotus japonicus* es una leguminosa modelo (Asamizu *et al.*, 2004; Márquez *et al.*, 2004). Es una planta herbácea anual (figura 30). Produce semillas cuyo área aproximada a partir de las imágenes fotográficas varía entre 1,3 y 1,6 mm<sup>2</sup>.

Las semillas de *Lotus japonicus* analizadas fueron cedidas por el profesor Peter Gresshoff de la Universidad de Queensland, Australia (ARC-CILR; *Centre of Excellence for Integrative Legume Research*).



Figura 30.- *Lotus japonicus* cultivada en invernadero. Planta, flor, fruto y semillas.

Los ecotipos analizados son Gifu y Miyakojima (MG-20). MG-20 procede de un hábitat más tropical que Gifu, de la cadena de islas de Miyakojima, al sur de Japón, y Gifu de la región de Tokio. Estos ecotipos difieren en su sensibilidad al ácido abscísico (ABA) para la germinación y otros rasgos relacionados con el fotoperiodo (Biswas *et al.*, 2009).



Figura 31.- Localización de las variedades Gifu (35,47° N - 136,72° E) y Miyakojima (24,8° N - 125,28° E).

Todos los mutantes utilizados tienen como fondo genético uno de estos 2 ecotipos: *Ljetr1-1* y *Ljhar1-1* (Gifu), *enigma-1* y *beyma* (MG-20).



#### Descripción de los mutantes de *Lotus japonicus*

- *Ljetr1-1* es una línea transgénica estable obtenida a partir de una transformación de Gifu con la mutación dominante en el gen receptor de etileno ETR1-1 de *Arabidopsis* (Lohar *et al.*, 2009).
- *Ljhar1-1* es un mutante de la variedad de Gifu en HAR1, un gen implicado en la regulación sistémica de la nodulación y estructuralmente relacionado con el gen CLAVATA1 (CLV1) de *Arabidopsis thaliana* (Wopereis *et al.*, 2000; Krusell *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2002).
- El mutante *enigma-1* es uno de los tres mutantes independientes del gen de *Lotus* EIN2a en el fondo de MG-20, producido por mutagénesis con EMS y seleccionado por la insensibilidad al etileno en el crecimiento de la raíz de las plántulas en M2 (Chan *et al.*, 2013).
- *beyma* es un mutante insensible al ácido abscísico, obtenido mediante mutagénesis con EMS y utilizando ácido abscísico para inhibir el crecimiento de la raíz como criterio de selección. La palabra *beyma* procede de la lengua aborigen australiana y significa "seco" (Biswas *et al.*, 2009).

#### 1.4. *Medicago truncatula*

*Medicago truncatula* es una leguminosa modelo (Ulrike *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2001). Es una planta herbácea anual. El área estimada a partir de las imágenes fotográficas de sus semillas secas varía entre 4,67 y 5,28 y mm<sup>2</sup> (figura 32).



Figura 32.- *Medicago truncatula*. A la derecha la flor, fruto y semillas.

Las semillas utilizadas de *Medicago truncatula*, son del tipo silvestre A17, y del mutante insensible al etileno *sickle* (*skl*) que tiene una mayor nodulación (Penmetsa *et al.*, 2008). Al igual que *enigma-1* (*Lotus*), *sickle* es un mutante en el gen EIN2 de *Arabidopsis* (MtSkl1 en *Medicago*) un componente integral de la vía de detección del etileno.

## 2. Medio y condiciones de cultivo.

El medio de cultivo empleado para la imbibición de las semillas fue Agar Bacteriológico Europeo Hispalab, S.A. PRONADISA, al 1% en agua destilada.

Las semillas, una vez fotografiadas, se colocaron en placas de Petri con agar al 1% y se dejaron durante 24 horas en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura de 23°C. Después de 24 horas se volvieron a fotografiar.

Para el cuarto experimento correspondiente al estudio del cambio en la forma durante la germinación se tomaron imágenes de las semillas secas, y después se colocaron las semillas en las placas de Petri. Se dejaron así las semillas bajo la lupa a temperatura ambiente y para cada semilla se hicieron un total de diecisiete fotografías sucesivas. Para los tipos silvestres se tomaron imágenes en los siguientes tiempos: 5, 15, 30 minutos, 1 hora, 1 hora y media, 2, 3, 4, 5 horas y media, 6, 8, 10, 24, 26, 28 y 30 horas. Para los mutantes: 5, 15, 30, minutos 1 hora, 1 hora y media, 2, 3, 4, 5 horas y media, 6, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30 horas. Los datos se introdujeron en una hoja Excel en la que se hizo un análisis descriptivo (medias y gráficos) Los datos posteriormente se pasaron a SPSS para el análisis univariante y la regresión curvilínea (ver página 98).



### 3. Fotografía y análisis de las imágenes

Para la observación de las imágenes de las semillas se utilizó una lupa binocular Nikon 'SMZ-2T' con un objetivo de hasta 6X y una fuente de iluminación Volpi-intralux 5000-1 *fiber optic cold light sources*. Las fotografías de las vistas longitudinales fueron tomadas con una cámara fotográfica Nikon 'Coolpix 950' con un adaptador para la lupa.

La composición de las imágenes analizadas se realizó con el programa Adobe Photoshop® CS4.

Para el análisis de las imágenes en los experimentos de ajuste a la cardioide se utilizó Photoshop® CS4. Tanto en los experimentos de imbibición con *Arabidopsis* como en *Capparis spinosa* se utilizó el programa de libre distribución ImageJ® (*Java image procesing program*).

La cardioide es la curva que describe un punto fijo de una circunferencia al hacerla rodar, sin deslizamiento, alrededor de otra circunferencia fija de su mismo radio (figura 33).

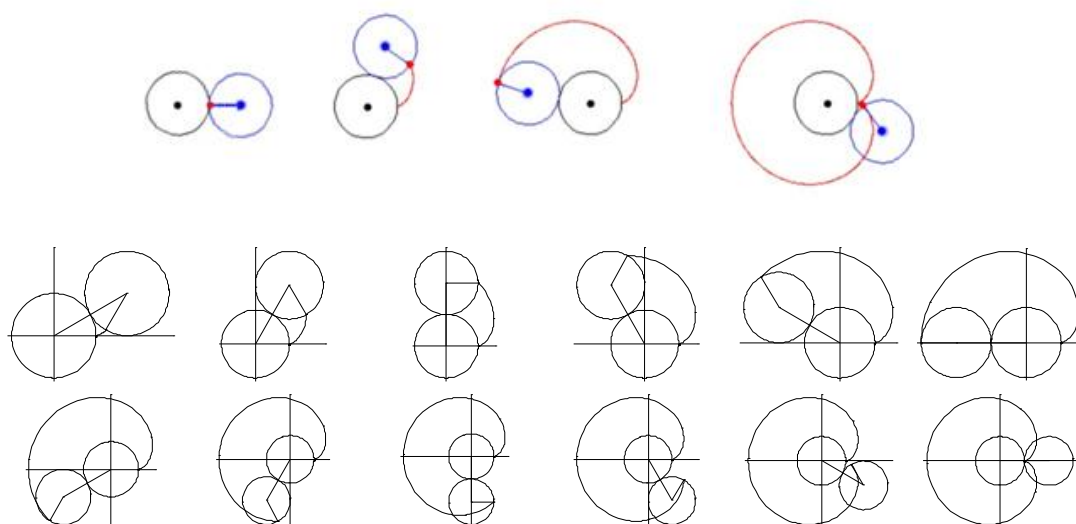


Figura 33.- Formación de una curva cardioide. Debajo representación de distintos pasos en el dibujo de la curva cardioide realizada con el programa Mathematica 4.1®.

Las sección de las semillas de *Lotus japonicus* y de *Capparis spinosa* se ajustan bien a una curva cardioide sin modificar, pero para obtener un buen ajuste con las semillas de *Arabidopsis thaliana* y de *Medicago truncatula* hubo que modificar ésta en el eje longitudinal o en el vertical respectivamente. El factor por el que se escalaron los ejes fue igual al número  $\phi$ , es decir a la proporción áurea.

Las diferentes curvas cardioide fueron dibujadas con el programa Mathematica4.1<sup>®</sup> (figura 34). El código fuente utilizado para obtener los dibujos es:

```
ParametricPlot [{(2Cos[t]-Cos[2t]),2Sin[t]-Sin[2t]},  
{t,0,2Pi}, AspectRatio -> Automatic]
```

Para la cardioide modificada en el eje X por un factor igual a  $\phi$

```
ParametricPlot [{(2Cos[t]-Cos[2t])*GoldenRatio,2Sin[t]-  
Sin[2t]}, {t,0,2Pi}, AspectRatio -> Automatic]
```

Para la cardioide modificada en el eje Y por el factor  $\phi$ :

```
ParametricPlot[{2Cos[t]-Cos[2t],(2Sin[t]-Sin[2t])*  
GoldenRatio}, {t,0,2Pi}, AspectRatio -> Automatic]
```

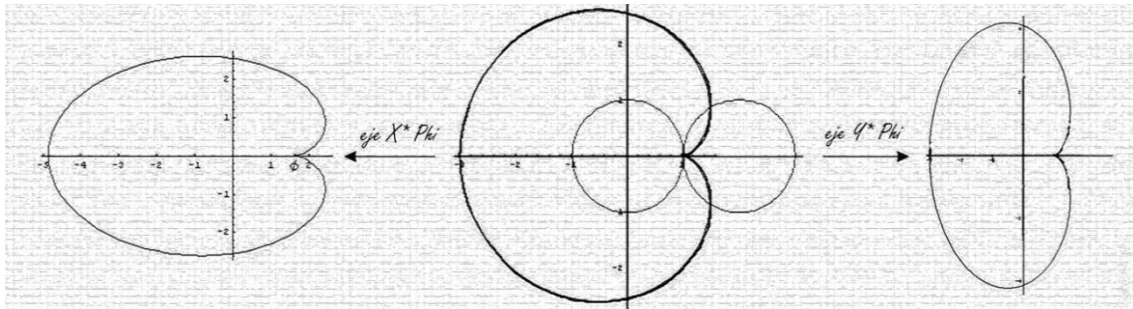


Figura 34.- En el centro curva cardioide sin modificar y a derecha e izquierda escalada por un factor igual a  $\phi$  en el eje X y en el eje Y respectivamente.

Se realizaron imágenes combinadas a partir de las fotografías de las semillas mediante la adaptación sobre las mismas de las figuras de curvas cardioides obtenidas con el programa Mathematica<sup>®</sup> (figura 35).

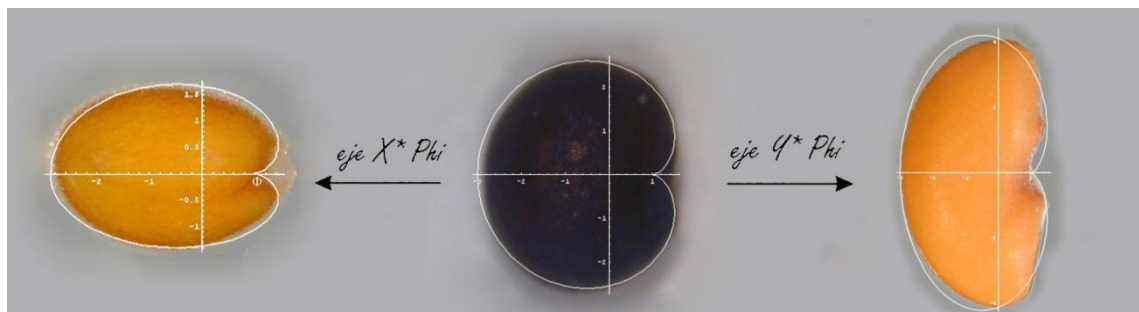


Figura 35.- Composición de las imágenes para su análisis, a la izquierda semilla de *Arabidopsis*, en el centro la de *Lotus* y a la derecha la de *Medicago* con las cardioides que mejor se ajustan a su forma.

Estas imágenes se utilizaron para realizar los cálculos correspondientes con objeto de obtener magnitudes que permitieran la cuantificación de la forma (ver página 82 y 83).

Para el análisis de las semillas por cuadrantes que se realizó en *Capparis* se divide la curva cardioide en cuatro secciones (Q1, Q2, Q3, Q4; figura 36), determinadas por los ejes coordenados con origen en el centro de la circunferencia fija.

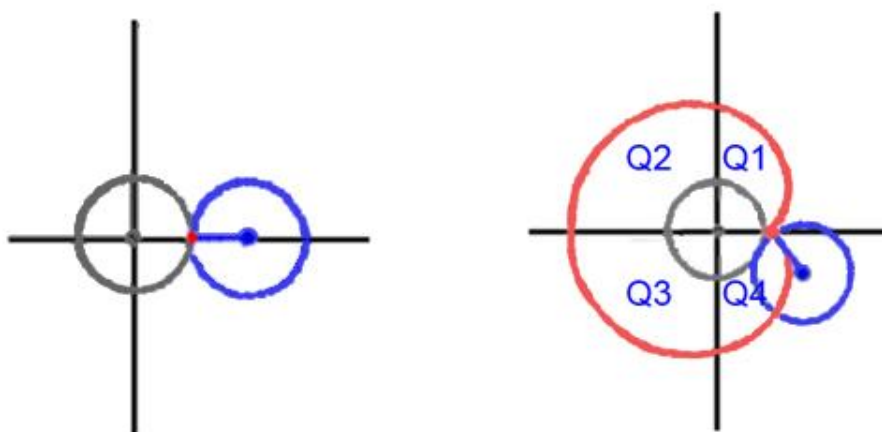


Figura 36.- Cardioide dividida en cuadrantes para el análisis de las semillas de *Capparis*.

## 4. Análisis matemático

### 4.1 Índice de Circularidad

El índice de circularidad (Schwarz, 1980) de una figura plana es una medida del grado con el que la figura se asemeja a un círculo. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$I = \frac{4 * \pi * \text{área}}{\text{perímetro}^2}$$

Los valores que puede tomar esta expresión matemática para cualquier figura geométrica están comprendidos entre 0 y 1. El resultado máximo se obtiene para un círculo y es igual a 1.

### 4.2 Índice G

Para una cardioide generada por circunferencias de radio =  $a$ , el área es igual a  $A = 6\pi * a^2$  y el perímetro  $p = 16a$ ; de esta forma tenemos que  $A/p^2$  es constante e igual a  $3\pi/128$ . Normalizando este cociente, para cualquier cardioide, el ratio  $F = 128A/3\pi P^2$  es igual a 1.

Para ajustar la cardioide a la figura de la semilla de *Arabidopsis*, el eje X se alargó por un factor igual a  $\phi$ . Para esta cardioide modificada el ratio  $A/P^2$  es constante e igual a  $1/14,59$ . Para evaluar la eficacia del ajuste de la imagen de la semilla a una cardioide modificado el índice utilizado fue:

$$G = 14,59 \frac{A}{P^2}$$

donde  $A$  y  $P$  son respectivamente el área y el perímetro de cada imagen. Este índice G, que es igual a 1 para la figura de una cardioide alargada en el eje X por un factor igual a la proporción áurea ( $\phi$ ), se utilizó con las semillas de *Arabidopsis*. El índice G es una estimación de la similitud entre la imagen fotográfica de una semilla y esta figura ideal. Obsérvese que no tiene una validez comparable al índice de circularidad. Mientras que el valor máximo del índice de circularidad es igual a 1 y ocurre sólo en el caso del círculo, por el contrario, el índice G puede tener valores superiores a 1 y además, puede ser igual a 1 en otras figuras geométricas. Para evitar estos inconvenientes, en experimentos posteriores se ha utilizado el índice J, que se describe a continuación.

### 4.3 Índice J

El índice J representa el porcentaje de coincidencia (parecido) entre una semilla y la figura geométrica con la que la comparamos (figura 37). Al superponer una figura geométrica con la imagen de una semilla, en la imagen final se pueden medir distintas áreas de estas se tendrán en cuenta: el área común a ambas figuras y el área no común, con estas medidas podemos calcular el porcentaje de coincidencia entre las dos figuras. Este índice se utiliza para cuantificar el ajuste de las imágenes de las semillas con la curva cardioide. El ajuste se hizo para cada semilla comparando el área de dos regiones: la región común a la semilla y la cardioide (denotada C), y la región de las áreas no compartidas (denotada D).

$$J = \frac{\text{area}(C)}{\text{area}(C) + \text{area}(D)} \times 100$$

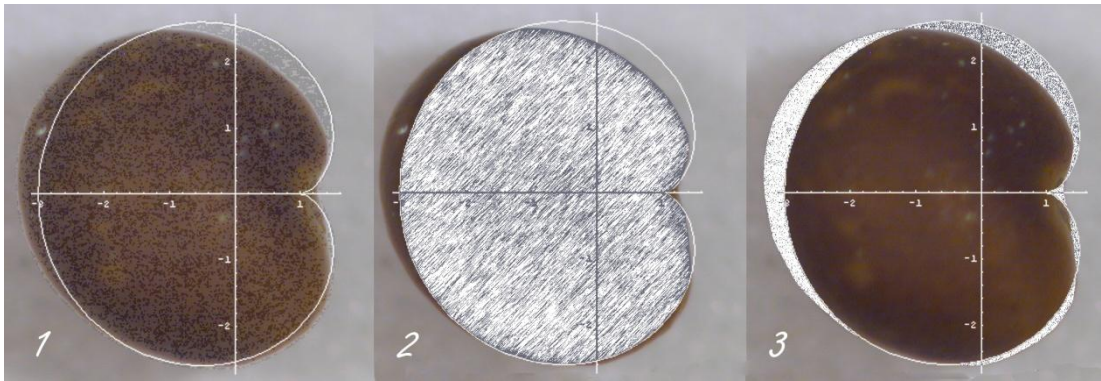


Figura 37.- Cálculo del índice J. 1) Figura formada por la semilla y la cardioide. 2) Área común a las dos figuras (área C). 3) Área no común en la figura (área D).

## 5. Análisis estadístico

### 5.1. Análisis descriptivo

Con los datos obtenidos durante los experimentos se realizó un primer análisis descriptivo con SPSS. Se ha usado como estadístico descriptivo de tendencia central la media, y como estadísticos de variabilidad o dispersión el rango, la varianza y la desviación típica, entre otros. La varianza  $\delta^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$  representa la media de las diferencias cuadráticas de  $n$  puntuaciones con respecto a su media aritmética, con lo que indica lo agrupados que están los datos.

Al representar los resultados se han utilizado gráficos de líneas para la evolución de una variable continua y gráficos de barras y de sectores para comparar la misma variable en distintas poblaciones.

### 5.2. Análisis estadístico

Además del análisis descriptivo de los datos obtenidos se efectuaron distintos análisis estadísticos, generalmente mediante contraste de hipótesis. En ellos se fijó como nivel de significación el valor  $\alpha = 0,05$ .

Para comparar medias poblacionales se utilizó ANOVA (prueba T de Student en el caso de dos poblaciones) tratando los datos con SPSS. La homogeneidad de las varianzas se contrastó con la prueba de Levene.

En los casos en que ANOVA condujo a rechazar la hipótesis nula, se realizaron análisis a posteriori (*post hoc*) para determinar grupos significativamente distintos. Los test utilizados para tal fin fueron el de Scheffé para muestras de tamaño heterogéneo y el de Tukey para muestras homogéneas.

El modelo basado en una cardioide se aplicó al estudio del cambio en la forma durante la germinación. Se trata en este caso del análisis de un proceso dinámico y, a diferencia de los casos anteriores, el contraste de hipótesis no se lleva a cabo entre conjuntos de datos correspondientes a situaciones estáticas (medidas en un único instante), sino que se refiere a comparaciones entre conjuntos de datos procedentes de distintos momentos en el progreso de la imbibición de la semilla. El análisis comparativo de las semillas en las variables mensurables (área, índice J, etc.) se realizó mediante ANOVA, empleando un modelo lineal general con factores fijos "genotipo" y "momento" y factor aleatorio "semilla". En caso de que la variedad no fuera significativa ( $p > 0.05$ ) se descartaba este factor y se repetía el ANOVA con los demás. En

los casos en que el factor “variedad” resultaba significativo ( $p > 0.05$ ) se realizó un análisis *post-hoc* mediante el test DHS-Tukey para obtener grupos de variedades homogéneas. Bien para todas las variedades en el primer caso, bien para los grupos homogéneos obtenidos en el segundo, se estimaron los parámetros del modelo. A dichas estimaciones se ajustó una función del tiempo real en que se habían tomado las medidas. Se realizaron diferentes análisis de regresión: lineal, logarítmico, inverso, cuadrático, cúbico, compuesto, potencia, S, crecimiento, exponencial y logístico ver, como ejemplo la tabla 8.

Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros									
Variable dependiente: area									
Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros			
	R <sup>2</sup>	F	gl1	gl2	sig.	Constante	b1	b2	b3
Lineal	,636	31,454	1	18	,000	,215	,004		
Logarítmica	,970	583,75	1	18	,000	,222	,017		
Inversa	,650	33,414	1	18	,000	,256	-,001		
Cuadrático	,869	56,335	2	17	,000	,189	,012	,000	
Cúbico	,934	74,889	3	16	,000	,175	,022	-,002	0,00004
Compuesto	,562	23,117	1	18	,000	,212	1,017		
Potencia	,990	1737,1	1	18	,000	,217531	,07808		
S	,732	49,077	1	18	,000	-1,364	-,005		
Crecimiento	,562	23,117	1	18	,000	-1,549	,017		
Exponencial	,562	23,117	1	18	,000	,212	,017		
Logística	,562	23,117	1	18	,000	4,708	,983		

Tabla 8.- Resumen de los diferentes ajustes para la evolución del área durante la imbibición.

Mediante el índice de correlación múltiple se evaluó la bondad del ajuste, obteniendo, generalmente, mejores resultados para el modelo logarítmico

$$y = b_0 + b_1 * \log(x).$$

Por este motivo los resultados que se presentan se refieren siempre a dicho modelo.

El tratamiento estadístico y el gráfico en el que se representa la curva modelo resultante del ajuste se realizaron con el programa SPSS® v. 20. Se emplearon 6 dígitos de precisión en los cálculos. Para obtener el resto de los gráficos se utilizó la hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 2010®.





## RESULTADOS

---



## 1. *Arabidopsis thaliana*



### 1.1 La curva cardioide modificada mediante un cambio en la escala por un factor igual a la proporción áurea es un modelo para la forma de las semillas de *Arabidopsis*

La imagen fotográfica de una semilla de *Arabidopsis* en su visión ortogonal plana (fig. 38a) se parece a una cardioide alargada (fig. 38d) más que a una elipse (fig. 38b). Para optimizar el ajuste partimos de una cardioide (fig. 38c), y escalamos el eje x por un factor igual a la proporción áurea (fig. 38d).

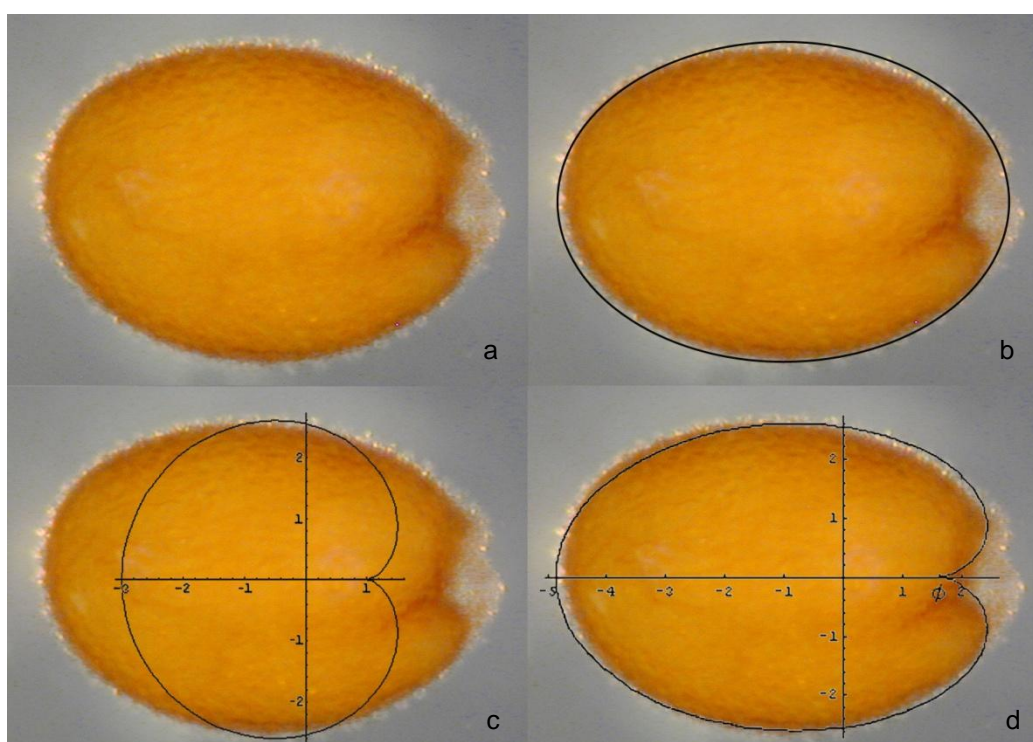


Figura 38.- Modelo de la forma de las semillas de *Arabidopsis* con una cardioide: Eficacia del ajuste con un cambio en la escala por un factor igual a la proporción áurea.

El índice G (descrito en materiales y métodos, página 82) es una estimación cuantitativa del parecido de una imagen con una curva cardioide modificada. En *Arabidopsis* se aproxima a 1 (0,91 en las semillas secas de la variedad Columbia y 0,97 en las semillas de la misma variedad después de la imbibición; ver página 96 y Cervantes *et al.*, 2010). El índice J (ver materiales y métodos, página 83) se estimó en las dos variedades de tipo silvestre, Columbia y Wassilewskija. Al igual que el índice G, es mayor en la semilla embebida (tabla 22; valores por encima de 90) que en la semilla seca (valores de 86 en ambos casos). En los primeros momentos de la imbibición alcanza el valor máximo para después volver a disminuir (figura 43 página 103 y 47 página 111).

## 1.2 Aplicación del modelo a variedades y mutantes en la ruta del etileno

### 1.2.1 Experimento 1

En un experimento realizado en el mes de abril del año 2009 con 125 semillas de cada genotipo se compararon las áreas, la relación largo/ancho y el índice G de Columbia y los genotipos *ctr1-1*, *eto1-1*, *etr1-1* y triple mutante en semillas secas y semillas a las 24 horas de imbibición.

Durante la imbibición, las semillas aumentan su área en un 44,5 % como media (tabla 9, figura 39 A).

El valor medio del cociente largo/ancho para las semillas secas del tipo silvestre Columbia es 1,66 y disminuye durante la imbibición hasta 1,29. Durante el curso de la imbibición en algún momento el cociente largo/ancho tendrá un valor igual a  $\varphi \approx 1,618$ .

El índice G aumenta durante la imbibición (tabla 14).

#### Área

La medida del área se llevó a cabo sobre imágenes de semillas secas y de semillas embebidas durante 24 horas. Las semillas después de la imbibición son mayores que las semillas secas en todos los genotipos (tabla 9).

	Secas	Imbibición	t-Student sig.(bilateral)	% Crecimiento
Columbia	0,148 (0,02)	0,211 (0,04)	0,00	42,4
<i>ctr1-1</i>	0,147 (0,03)	0,221 (0,05)	0,00	51,1
<i>eto1-1</i>	0,140 (0,02)	0,206 (0,04)	0,00	47,8
<i>etr1-1</i>	0,142 (0,03)	0,191 (0,03)	0,00	36,2
triple mutante	0,173 (0,03)	0,249 (0,04)	0,00	44,7
Medias	0,150 (0,03)	0,215 (0,04)		44,5

Tabla 9.- Comparación del área entre las semillas secas y después de la imbibición. Valores medios del área en mm<sup>2</sup> (desviación típica) y porcentaje de crecimiento.

Al comparar el área de las semillas secas entre los distintos genotipos mediante ANOVA de un factor, se obtuvo el resultado de la tabla 10 (izquierda). Para las semillas después de 24 horas de imbibición los resultados son los de la tabla 10 (derecha).

	Semillas secas					Semillas embebidas (24hr)				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,089	4	0,22	30,588	<b>,000</b>	0,230	4	0,057	34,99	<b>0,00</b>
Intra-grupos	4,52	620	0,001			1,018	620	0,002		
Total	5,42	924				1,248	624			

Tabla 10.- Resultados de ANOVA para el área de semillas secas (izquierda) y semillas embebidas (derecha).

El análisis *post hoc* reveló que las semillas del triple mutante son más grandes tanto antes como después de la imbibición (tabla 11). Después de la imbibición se establecen cuatro grupos por el tamaño: las semillas de *etr1-1* son las menores, *ctr1-1* tiene semillas más grandes que *etr1-1* y que *eto1-1* (tabla 11 derecha, figura 39).

Área para semillas secas				Área para semillas después de imbibición				
Nº. de semillas	Genotipo	Subconjuntos para alfa=.05		Genotipo	Subconjuntos para alfa=.05			
		1	2		1	2	3	4
125	<i>eto1-1</i>	0,14		<i>etr1-1</i>	0,19			
125	<i>etr1-1</i>	0,14		<i>eto1-1</i>		0,21		
125	<i>ctr1-1</i>	0,15		Columbia		0,21	0,21	
125	Columbia	0,15		<i>ctr1-1</i>			0,22	
125	triple mutante		0,17	triple mutante				0,25
Sig.	Sig.	0,134	1	Sig.	1	0,86	0,30	1

Tabla 11.- Análisis *post hoc* para el área de los distintos genotipos. A la izquierda las semillas secas y a la derecha las semillas después de la imbibición.

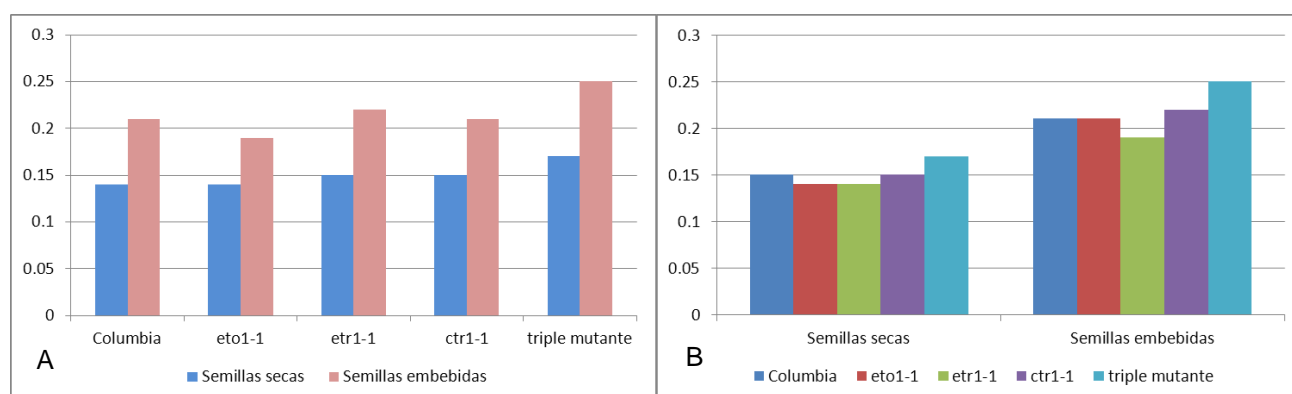


Figura 39.- A) Diferencias en el área entre semillas secas y semillas embebidas en un mismo genotipo. B) Diferencias en el área entre los distintos genotipos.

El ANOVA para el porcentaje del aumento del área en las semillas durante la imbibición dio los siguientes resultados (Tabla 12).

	% crecimiento				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	15956,01	4	3989,0	15,154	<b>,000</b>
Intra-grupos	163207,,	620	263,237		
Total	179163,1	924			

Tabla 12.- ANOVA de un factor para analizar el porcentaje de crecimiento entre los distintos genotipos.

El mutante *etr1-1* es el que menos crece (36,2%) y el mutante *ctr1-1* crece más que los demás genotipos salvo *eto1-1* (tabla 13).

genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
<i>etr1-1</i>	125	36,2		
Columbia	125		42,4	
triple mutante	125		44,7	
<i>eto1-1</i>	125		47,8	47,8
<i>ctr1-1</i>	125			51,1
Sig.		1,00	,071	,479

Tabla 13.- Test *post hoc* para el aumento del área de las semillas después de 24 horas de imbibición.

### Relación largo/ancho

La relación longitud/anchura en la semilla seca del tipo silvestre Columbia está cerca de la proporción áurea (1,618) y disminuye en el curso de la imbibición en todos los genotipos.

En las semillas secas los valores medios varían desde 1,53 para *etr1-1* hasta 1,67 en el triple mutante y después de la imbibición estos valores pasan a ser de 1,29 en Columbia a 1,39 para *etr1-1* (tabla 14).



Genotipo	Secas	Embebidas	t-Student sig.(bilateral)
Columbia	1,66 (0,17)	1,29 (0,10)	0,00
<i>ctr1-1</i>	1,66 (0,15)	1,30 (0,10)	0,00
<i>eto1-1</i>	1,65 (0,13)	1,29 (0,08)	0,00
<i>etr1-1</i>	1,53 (0,22)	1,39 (0,14)	0,00
<i>triple mutante</i>	1,67 (0,17)	1,33 (0,11)	0,00
Medias	1,63 (0,18)	1,32 (0,11)	

Tabla 14. Prueba t-Student para la relación largo/ancho entre semillas secas y semillas embebidas en los distintos genotipos.

Al comparar la relación largo/ancho de las semillas secas entre los distintos genotipos mediante ANOVA de un factor, se obtuvo el resultado de la tabla 15 (izquierda). Para las semillas después de 24 horas de imbibición los resultados son los de la tabla 15 (derecha).

	Semillas secas					Semillas embebidas (24hr)				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,611	4	,403	13,8	<b>,000</b>	,996	4	,249	21,9	<b>,000</b>
Intra-grupos	18,105	620	,029			7,051	620	,011		
Total	19,717	624				8,047	624			

Tabla 15.- Resultados de ANOVA para la relación largo/ancho de semillas secas (izquierda) y semillas embebidas (derecha).

El análisis *post hoc* reveló que los valores de la relación largo/ancho son más bajos en las semillas secas de los mutantes *etr1-1* que en las semillas de otros genotipos. En contraste, después de 24 horas de imbibición, la relación largo/ancho es mayor en los mutantes *etr1-1* y en el triple mutante. Los valores en *eto1-1* y *ctr1-1* no difieren de los del tipo silvestre. En todos los genotipos esta proporción disminuye durante la imbibición a valores menores que  $\phi$  (tabla 16, figura 40).

Núm. semillas	semillas secas			semillas embebidas			
	Genotipo	Subconjunto para alfa=.05		Genotipo	Subconjunto para alfa=.05		
		1	2		1	2	3
125	<i>etr1-1</i>	1,53		<i>eto1-1</i>	1,29		
125	<i>eto1-1</i>		1,65	Columbia	1,29		
125	Columbia		1,66	<i>ctr1-1</i>	1,30		
125	<i>ctr1-1</i>		1,66	Triple mutante		1,33	
125	Triple mutante		1,67	<i>etr1-1</i>			1,39
	Sig.	1	0,89	Sig.	0,94	1,00	1,00

Tabla 16.- ANOVA de un factor entre genotipos para la relación largo/ancho. Izquierda semillas secas, derecha semillas después de la imbibición.

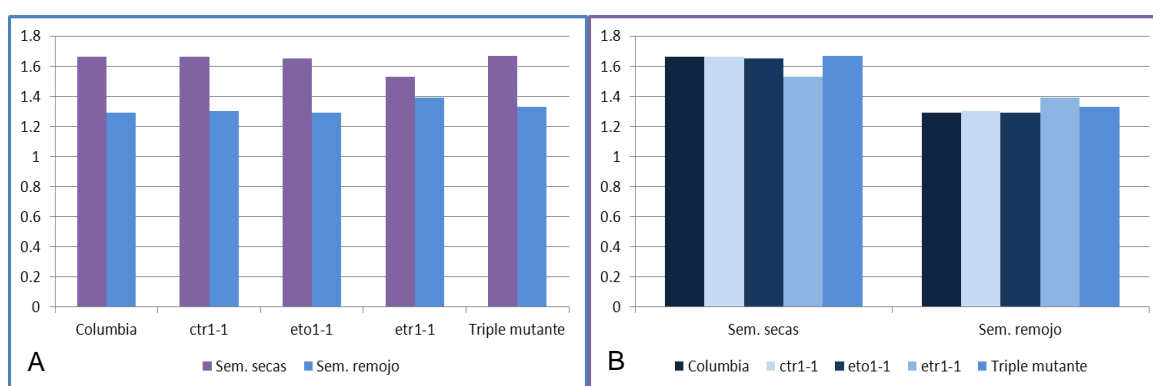


Figura 40.- Gráficos de la relación largo/ancho A) diferencia entre semillas secas y semillas embebidas B) diferencias entre los genotipos.

## Índice G

El índice G es menor en las semillas secas para todos los genotipos (tabla 17).

	Secas	embebidas	t-Student sig.(bilateral)
Columbia	0,906 (0,04)	0.965 (0,02)	0,00
<i>ctr1-1</i>	0,895 (0,03)	0.958 (0,02)	0,00
<i>eto1-1</i>	0,904 (0,03)	0.967 (0,02)	0,00
<i>etr1-1</i>	0,891 (0,05)	0.932 (0,04)	0,00
Triple mutante	0,895 (0,03)	0.960 (0,02)	0,00
Medias	0,900 (0,04)	0,956 (0,03)	

Tabla 17.- Media del Índice G y (desviación típica) en las semillas secas y en embebidas en los distintos genotipos.

Al comparar el índice G de las semillas secas entre los distintos genotipos mediante ANOVA de un factor, se obtuvo el resultado de la tabla 18 (izquierda). Para las semillas después de 24 horas de imbibición los resultados son los de la tabla 18 (derecha).

	Semillas secas					Semillas embebidas (24hr)				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,21	4	,005	3,83	<b>,004</b>	,095	4	,24	34,4	<b>,000</b>
Intra-grupos	0,847	620	,001			0,428	620	,001		
Total	0,868	624				0,523	624			

Tabla 18.- Resultados de ANOVA para el índice G de semillas secas (izquierda) y semillas embebidas (derecha).

Las semillas del genotipo mutante *etr1-1* presentan valores más bajos en el índice G que en *eto1-1* o el tipo silvestre Columbia; y esto es así tanto para las semillas secas como para las semillas después de la imbibición (tabla 19, figura 41).

		Semillas secas		Semillas embebidas 24 hr.	
Núm.	Genotipo	Subconjunto para alfa=.05		Subconjunto para alfa = .05	
Semillas		1	2	1	2
125	<i>etr1-1</i>	0.891		0.932	
125	<i>ctr1-1</i>	0.895	0.895		0.958
125	triple mutante	0.895	0.895		0.960
125	<i>eto1-1</i>		0.904		0.967
125	Columbia		0.906		0.965
Sig.		0.876	0.112	1	0.06

Tabla 19.- ANOVA de un factor entre genotipos para el índice G. Izquierda, semillas secas; derecha, semillas después de la imbibición.

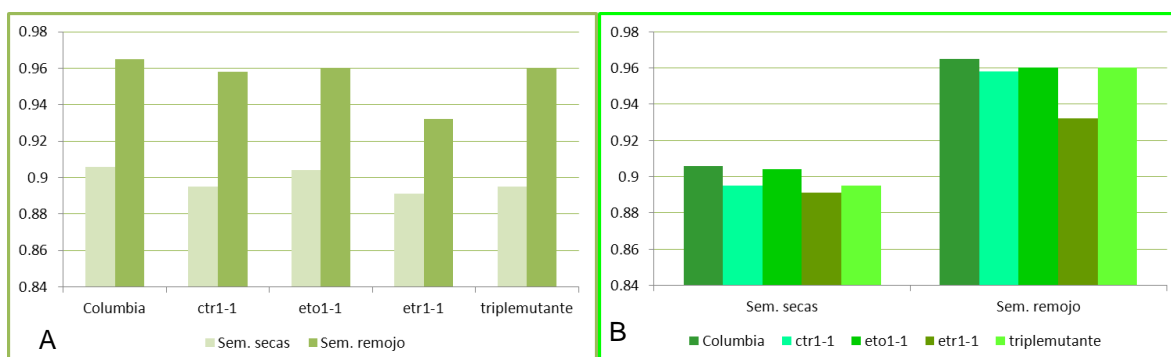


Figura 41.- Gráficos para el índice G. A) diferencia entre semillas secas y semillas embebidas B) diferencias entre los genotipos.

### 1.2.2 Experimento 2

Realizado en abril de 2008 con 20 semillas de cada genotipo. Se compararon las áreas de Columbia, triple mutante y *ein2-1* en semillas secas y semillas con 24 horas de imbibición.

Al comparar el área de las semillas secas entre los distintos genotipos mediante ANOVA de un factor, se obtuvo el resultado de la tabla 20 (izquierda). Para las semillas después de 24 horas de imbibición no hubo diferencias entre los genotipos tabla 20 (derecha).

	Semillas secas					Semillas embebidas (24hr)				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,002	2	,0012	3,38	,004	0,005	2	,002	2,44	,096
Intra-grupos	0,021	56	,0003			0,057	56	,001		
Total	0,022	58				0,062	58			

Tabla 20.- Anova para el área de las semillas secas (izquierda) y semillas embebidas (derecha).

El área media resultó mayor en semillas de *ein2-1* que en Columbia en semillas secas (tabla 21)

Área para semillas secas			
Genotipo	Nº. semillas	Subconjunto para alfa=.05	
		1	2
Columbia	19	,124	
Triple mutante	20	,127	,127
<i>ein2-1</i>	20		,139
Sig.		,903	,121

Tabla 21.- ANOVA de un factor entre genotipos para el área de las semillas secas.

### 1.2.3 Experimento 3

Realizado en febrero de 2010. Se utilizaron 10 o 20 semillas dependiendo del genotipo, se compararon los valores de área, circularidad e índice J para los genotipos Columbia, triple mutante, *ctr1-1*, *etr1-1*, *eto1-1*, *ein2-1* (tablas 22, 23 y 24; figura 42).

Al analizar las diferencias entre las semillas secas y las semillas después de imbibición, tanto el área como el índice de circularidad aumentaron en todos los genotipos con la imbibición (tabla 22).

El índice J aumentó en los genotipos Columbia, triple mutante, *ctr1-1* y *ein2-1*. En *etr1-1* y en *eto1-1* no hubo diferencias entre semillas secas y semillas embebidas (tabla 22).

Genotipo	Tratamiento	Nº	Área	sig.	Circularidad	sig.	Índice J	sig.
Columbia	Sem. secas	20	0,12	0	0,77	0	86,1	0,0
	Sem. embebidas	20	0,22		0,83		90,1	
Triple mutante	Sem. secas	10	0,12	0	0,77	0	85,9	0,0
	Sem. embebidas	10	0,22		0,82		91,1	
<i>ctr1-1</i>	Sem. secas	20	0,09	0	0,75	0	84,5	0,0
	Sem. embebidas	20	0,19		0,83		91,4	
<i>etr1-1</i>	Sem. secas	10	0,10	0	0,76	.039	84,9	0,056
	Sem. embebidas	10	0,19		0,79		88,7	
<i>eto1-1</i>	Sem. secas	20	0,12	0	0,79	0	88,8	0,551
	Sem. embebidas	10	0,24		0,84		89,5	
<i>ein2-1</i>	Sem. secas	20	0,10	0	0,76	0	85,0	0,001
	Sem. embebidas	20	0,19		0,83		89,4	

Tabla 22.- Test t-Student entre semillas secas y semillas embebidas para el área, circularidad e índice J en los genotipos estudiados.

#### Área

Al comparar el área de las semillas secas entre los distintos genotipos mediante ANOVA de un factor, se obtuvo el resultado de la tabla 23 (izquierda). Para las semillas después de 24 horas de imbibición los resultados son los de la tabla 23 (derecha).

	Semillas secas					Semillas embebidas (24hr)				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,014	5	,003	9,54	,000	0,031	5	,006	5,26	,000
Intra-grupos	0,028	94	,000			0,098	84	,001		
Total	0,042	99				0,128	89			

Tabla 23.- ANOVA para el área de las semillas entre los distintos genotipo. Izquierda semillas secas, derecha semillas después de imbibición.

Entre genotipos, el área de las semillas del mutante *ctr1-1* ( $0,09 \text{ mm}^2$ ) fue menor que la de las semillas del triple mutante, *eto1-1*, y Columbia ( $0,12 \text{ mm}^2$ ). En las semillas después de la imbibición las diferencias las encontramos entre *eto1-1* ( $0,24 \text{ mm}^2$ ) y *ctr1-1*, *etr1-1* ( $0,19 \text{ mm}^2$ ) ; ver tabla 24 y figura 42.

AREA SEMILLAS SECAS					ÁREA SEMILLAS EMBEBIDAS			
Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2	3			1	2
<i>ctr1-1</i>	20	0,09			<i>ctr1-1</i>	20	0,19	
<i>ein2-1</i>	20	0,10	0,10		<i>etr1-1</i>	10	0,19	
<i>etr1-1</i>	10	0,10	0,10	0,10	<i>ein2-1</i>	20	0,19	0,19
Columbia	20		0,12	0,12	Columbia	20	0,22	0,22
<i>eto1-1</i>	20			0,12	triple mutante	10	0,22	0,22
triple mutante	10			0,12	<i>eto1-1</i>	10		0,24
Sig.		0,66	0,07	0,21	Sig.		0,16	0,05

Tabla 24.- Comparación del área de las semillas entre genotipos. Test de Scheffé después de ANOVA. Izquierda en semillas secas, a la derecha en semillas embebidas.

### Índice de circularidad

Al comparar el índice de circularidad entre los distintos genotipos mediante ANOVA de un factor, se observó que había diferencias tanto para las semillas secas como después de 24 horas de imbibición los resultados son los de la (tabla 25).

	Semillas secas					Semillas embebidas (24hr)				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,014	5	,003	3,24	0,01	0,018	5	,006	7,77	,000
Intra-grupos	0,082	94	,001			0,038	84	,000		
Total	0,096	99				0,056	89			

Tabla 25.- ANOVA para el índice de circularidad de las semillas entre los distintos genotipo. Izquierda semillas secas, derecha semillas después de imbibición.

Aunque ANOVA presenta diferencias entre semillas secas el test de Scheffé no mostró grupos diferentes entre los genotipos. Después de 24 horas de imbibición las semillas de *etr1-1* presentan un índice de circularidad menor que el resto de los genotipos (tabla 26, figura 42B).

Genotipo	N	Semillas secas	Semillas embebidas	
		Subconjunto para alfa = 0.05	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	1	2
<i>etr1-1</i>	10	0,76	0,79	
triple mutante	10	0,77		0,82
<i>ein2-1</i>	20	0,76		0,83
<i>ctr1-1</i>	20	0,75		0,83
Columbia	20	0,77		0,84
<i>eto1-1</i>	10	0,79		0,84
Sig.			1,00	0,82

Tabla 26.- Comparación del índice de circularidad de las semillas entre genotipos. Test de Scheffé después de ANOVA. Izquierda en semillas secas, a la derecha en semillas embebidas.

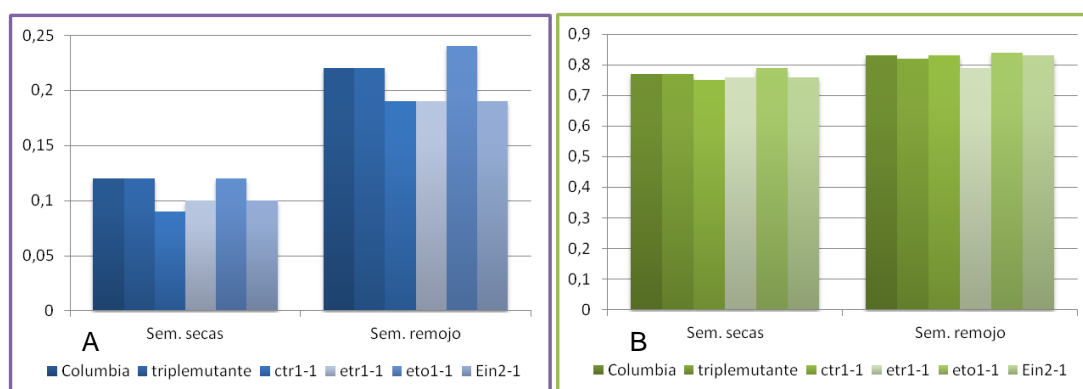


Figura 42.- Diferencias entre las semillas de los distintos genotipos y tratamientos A) para el área B) para el índice de circularidad.

## Índice J

Al comparar el índice J tanto de las semillas secas como después de imbibición, entre los distintos genotipos, mediante ANOVA de un factor, se observó que para las semillas secas había diferencias entre los genotipos. Para las semillas después de imbibición ANOVA no mostró diferencias (tabla 27).

	Semillas secas					Semillas embebidas (24hr)				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	233,6	5	46,72	3,09	,013	78,47	5	15,70	1,17	,328
Intra-grupos	1420,6	94	15,11			1121,4	84	13,350		
Total	1654,3	99				1199,9	89			

Tabla 27.- ANOVA para el índice J de las semillas entre los distintos genotipos. Izquierda: semillas secas. Derecha: semillas después de imbibición.

El test *post hoc* para el índice J de las semillas no mostró diferencias entre los genotipos.

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
<i>Ctr1-1</i>	20	84,549
<i>Etr1-1</i>	10	84,885
<i>Ein2-1</i>	20	84,994
triple mutante	10	85,863
Columbia	20	86,105
<i>Eto1-1</i>	20	88,816
Sig.		,119

Tabla 27 A.- Test *post hoc* para el índice J de las semillas secas.



### 1.3 Variación de la forma durante la imbibición

Se consideraron cuatro magnitudes: área, relación largo ancho, índice de circularidad e índice J. La figura 43 muestra un resumen de los datos obtenidos en distintos momentos del experimento. No obstante, el objetivo de este apartado no fue el de comparar conjuntos de datos pertenecientes a distintos momentos, sino obtener ecuaciones representativas del comportamiento de estos parámetros en cada uno de los genotipos.

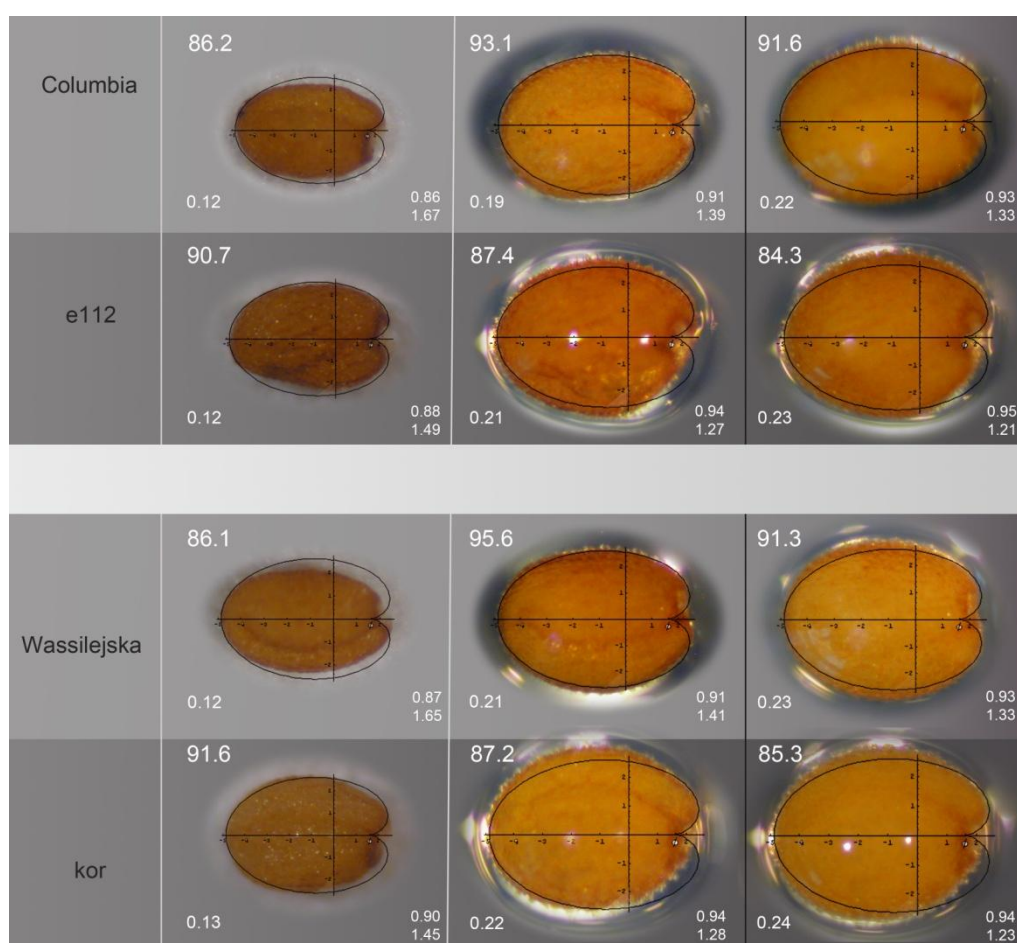


Figura 43.-Ajuste de la cardioide a las semillas de *Arabidopsis* durante la Imbibición. Tipo silvestre y su mutante. A la izquierda, semilla seca antes de la imbibición. En el centro, la semilla después de una hora y media en la placa Petri y a la derecha, después de 7 horas. En las semillas del tipo silvestre el mejor ajuste se produce entre la hora y media y tres horas aproximadamente; sin embargo en los mutantes es la semilla seca la que presenta un mejor ajuste.

Para cada imagen se muestra a la izquierda el índice J (arriba) y el área de la semilla (abajo); a la derecha, índice de circularidad y relación largo/ancho.

### 1.3.1 Área

El ANOVA reveló que no hubo diferencias entre los cuatro genotipos (tabla 28).

Origen		Suma de cuadrados tipo I	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	Hipótesis	23,028	1	23,028	1809,7	,000
	Error	,305	24,0	,013		
Genotipos	Hipótesis	,049	3	,016	1,276	,305
	Error	,305	24,0	,013		
Momento	Hipótesis	,405	19	,021	346,31	,000
	Error	,027	443	6,154E-005		
Semilla	Hipótesis	,305	24	,013	206,58	,000
	Error	,027	443	6,154E-005		

Tabla 28.- Pruebas de los efectos inter-sujetos la variable dependiente el área no presento diferencias entre los distintos genotipos.

Al considerar el cambio del área en semillas de los cuatro genotipos en conjunto, la estimación curvilínea mediante el modelo logarítmico dio como resultado la ecuación

$$y = 0.241 + 0.009 * \log(t)$$

donde t representa el tiempo medido en horas. El índice  $R^2$  obtenido garantiza la bondad del ajuste (tabla 29).

Ecuación logarítmica	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros	
	$R^2$	F	gl1	gl2	Sig.	Constante	b1
	,983	1044,21	1	18	,000	,241	,009

Tabla 29.- Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros de la ecuación para el área.

En la figura 44 se representan los resultados observados para las semillas de los cuatro genotipos junto con el modelo logarítmico propuesto.

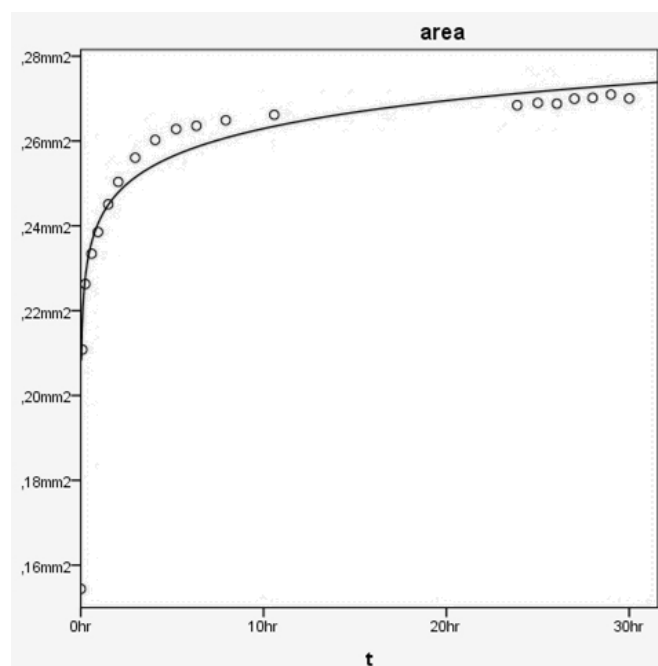


Figura 44.- Curva que representa la variación en el área de la semilla antes de la germinación.

### 1.3.2 Índice de Circularidad

El ANOVA reveló diferencias entre los genotipos (tabla 30) para los genotipos.

Origen		Suma de cuadrados tipo I	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	Hipótesis	424,015	1	424,015	167898,4	,000
	Error	,015	6	,003		
Genotipos	Hipótesis	,044	3	,015	50,117	,000
	Error	,135	461	,000		
Momento	Hipótesis	,101	19	,005	18,105	,000
	Error	,135	461	,000		
Semilla	Hipótesis	,015	6	,003	8,601	,000
	Error	,135	461	,000		

Tabla 30.- Pruebas de los efectos inter-sujetos. La variable dependiente ( índice de circularidad) presentó diferencias entre los distintos genotipos.

El análisis *post hoc* (tabla 31) reveló dos grupos homogéneos: el formado por Columbia y Wassilewskija (variedades codificadas como 1 y 2 respectivamente) y el formado por e-112 y kor1-1 (genotipos codificados como 3 y 4 respectivamente)

Genotipo	N	Subconjunto	
		1	2
1 Columbia	119	,9201	
2 Wassilewskija	119	,9210	
3 e-112	126		,9412
4 kor1-1	126		,9375
Sig.		,971	,343

Tabla 31.-Pruebas *post hoc* para los 4 genotipos.

Al considerar el cambio en el índice de circularidad en semillas de los dos genotipos silvestres (1, 2) en conjunto, la estimación curvilínea mediante el modelo logarítmico dio como resultado la ecuación  $y = 0.902 + 0.005 * \log(t)$ . El índice  $R^2$  obtenido garantiza la bondad del ajuste (tabla 32).

Ecuación logarítmica	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros	
	$R^2$	F	gl1	gl2	sig.	Constante	b1
	,909	150,372	1	15	,000	,902	,005

Tabla 32.- Resumen del modelo logarítmico aplicado a la circularidad de las semillas del grupo 1,2.

Al considerar el cambio de circularidad en semillas de los dos genotipos mutantes en conjunto, la estimación curvilínea mediante el modelo logarítmico dio como resultado la ecuación

$$y = 0.950 + 0.004 * \log(t).$$

El índice  $R^2$  obtenido garantiza la bondad del ajuste (tabla 33).

Ecuación logarítmica	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros	
	$R^2$	F	gl1	gl2	sig.	Constante	b1
	,821	73,474	1	16	,000	,950	,004

Tabla 33.- Resumen del modelo logarítmico aplicado a la circularidad de las semillas del grupo 3,4

En la figura 45 se representan los resultados observados para las semillas de los cuatro genotipos junto con el modelo logarítmico propuesto.

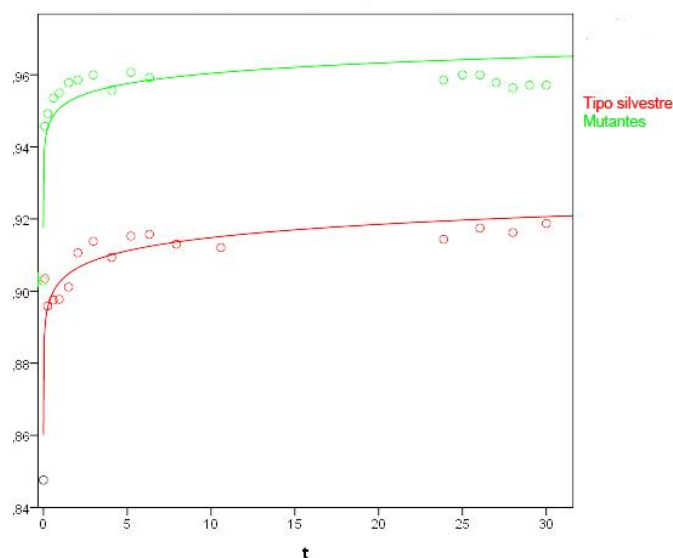


Figura 45.- Curvas que representan los cambios en el índice de circularidad durante la imbibición.

### 1.3.3 Relación Largo Ancho

El ANOVA reveló diferencias entre los grupos (tabla 34).

Origen		Suma de cuadrados tipo I	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	Hipótesis	843,865	1	843,865	14137,37	,000
	Error	1,433	24,000	,060 <sup>a</sup>		
Genotipos	Hipótesis	1,569	3	,523	9,202	,000
	Error	1,366	24,027	,057 <sup>c</sup>		
Momento	Hipótesis	2,725	19	,143	129,476	,000
	Error	,147	132,306	,001 <sup>b</sup>		
Semilla	Hipótesis	1,431	24	,060	89,461	,000
	Error	,295	443	,001 <sup>d</sup>		

Tabla 34.- Pruebas de los efectos inter-sujetos la variable dependiente relación largo/ancho presento diferencias entre los distintos genotipos

El análisis *post hoc* (tabla 35) reveló dos grupos homogéneos: el formado por Columbia y Wassilewskija (variedades codificadas como 1 y 2 respectivamente) y el formado por e-112 y kor1-1 (genotipos codificados como 3 y 4 respectivamente).

Genotipo	N	Subconjunto	
		1	2
1 Columbia	119	1,37531	
2 Wassilewskija	119	1,37618	
3 e-112	126		1,25053
4 kor1-1	126		1,25429
Sig.		,971	,343

Tabla 35.- Subconjuntos para la relación largo/ancho

Al considerar el cambio de la relación largo/ancho en semillas de los dos genotipos tipo silvestre (1,2) en conjunto, la estimación curvilínea mediante el modelo logarítmico dio como resultado la ecuación

$$y = 1.403 - 0.026 * \log(t).$$

El índice  $R^2$  obtenido garantiza la bondad del ajuste (tabla 36).

Ecuación logarítmica	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros	
	$R^2$	F	gl1	gl2	sig.	Constante	b1
	0,952	258,22	1	15	0	1,403	-0,026

Tabla 36.- Resumen del modelo logarítmico aplicado a la relación largo/ancho de las semillas del grupo 1,2.

Al considerar el cambio de relación largo/ancho en semillas de los dos genotipos tipo silvestre (1,2) en conjunto, la estimación curvilínea mediante el modelo logarítmico dio como resultado la ecuación  $y = 1.37 - 0.021 * \log(t)$ . El índice  $R^2$  obtenido garantiza la bondad del ajuste (tabla 37)

Ecuación logarítmica	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros	
	$R^2$	F	gl1	gl2	sig.	Constante	b1
	0,965	353,46	1	16	0	1,37	-0,021

Tabla 37.- Resumen del modelo logarítmico aplicado a la relación largo/ancho de las semillas del grupo 3,4

En la figura 46 se representan los resultados observados para las semillas de los cuatro genotipos junto con el modelo logarítmico propuesto.

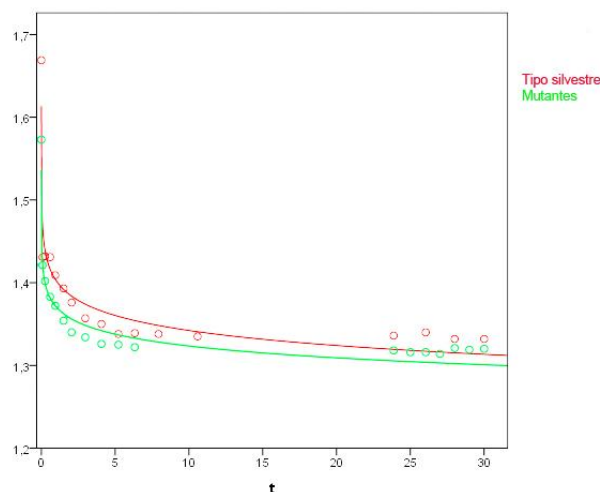


Figura 46.- Curvas que representan los cambios en la relación largo/ancho durante la imbibición.

### 1.3.4 Índice J

El ANOVA reveló diferencias entre los grupos (tabla 38).

Origen		Suma de cuadrados tipo I	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	Hipótesis	3873399,71	1	3873399,71	30509,21	,000
	Error	3046,775	23,998	126,958 <sup>a</sup>		
Genotipos	Hipótesis	3909,818	3	1303,273	10,276	,000
	Error	3043,914	24,001	126,827 <sup>b</sup>		
Momento	Hipótesis	536,454	19	28,234	4,887	,000
	Error	2559,626	443	5,778 <sup>c</sup>		
Semilla	Hipótesis	3044,629	24	126,860	21,956	,000
	Error	2559,626	443	5,778 <sup>c</sup>		

Tabla 38.- Pruebas de los efectos inter-sujetos. La relación largo/ancho presentó diferencias entre los distintos genotipos.

El análisis *post hoc* reveló dos grupos homogéneos (tabla 39): el formado por Columbia y Wassilewskija (variedades codificadas como 1 y 2 respectivamente) y el formado por e-112 y Kor1-1 (genotipos codificados como 3 y 4 respectivamente)

Índice J			
variedad	N	Subconjunto	
		1	2
1 Columbia	119	91,52790	
2 Wassilewskija	119	92,07193	
3 e-112	126		85,85905
4 Kor1-1	126		86,50024
Sig.		,159	,289

Tabla 39.- Subconjuntos para el índice J

Al considerar el cambio del índice J en semillas de los dos genotipos silvestres (1,2) en conjunto, la estimación curvilínea mediante el modelo logarítmico dio como resultado (tabla 40) la ecuación

$$y = 94,57 + 0.319 * \log(t).$$

El índice  $R^2$  obtenido en este caso es bajo y no garantiza la bondad del ajuste (tabla 40).

Ecuación logarítmica	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros	
	$R^2$	F	gl1	gl2	sig.	Constante	b1
	0,337	7,635	1	15	0,014	94,573	0,319

Tabla 40.- Resumen del modelo logarítmico aplicado al índice J de las semillas del grupo que contiene los genotipos silvestres (1,2)



Al considerar el cambio del índice J en semillas de los dos genotipos mutantes (3,4) en conjunto, la estimación curvilínea mediante el modelo logarítmico dio como resultado la ecuación  $y = 87,57 - 0,586 * \log(t)$ . El índice  $R^2$  obtenido garantiza la bondad del ajuste (tabla 41).

Ecuación logarítmica	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros	
	$R^2$	F	gl1	gl2	sig.	Constante	b1
	0,872	88,81	1	15	0,00	87,573	-0,586

Tabla 41.- Resumen del modelo logarítmico aplicado al índice J de las semillas del grupo que incluye los dos genotipos mutantes (3,4).

En la figura 47 se representan los resultados observados para las semillas de los cuatro genotipos junto con el modelo logarítmico propuesto.

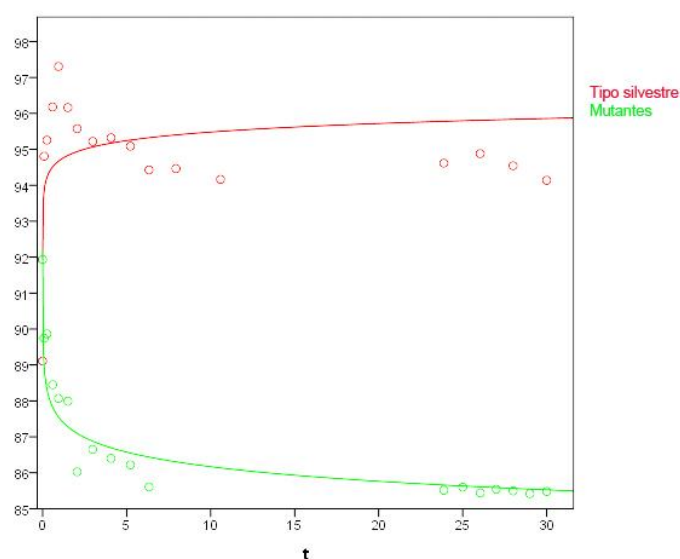


Figura 47.- Curvas que representan los cambios en el índice J durante la imbibición.

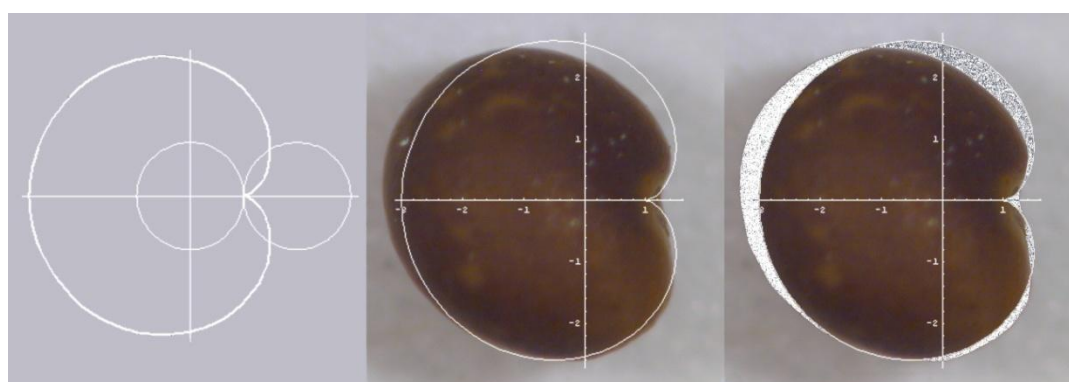


2. Leguminosas modelo  
*Lotus japonicus* y  
*Medicago truncatula*.

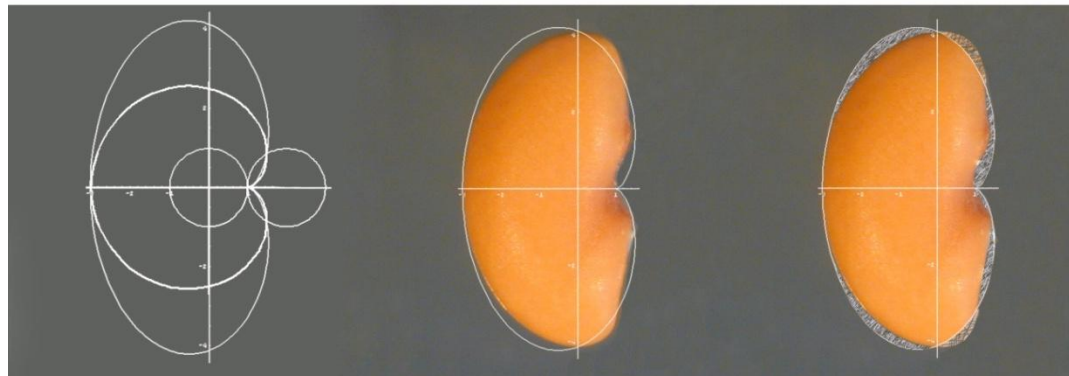


## 2.1 Modelo basado en una curva cardioide

De modo similar a lo hecho con *Arabidopsis* hemos descrito la forma de las semillas en las leguminosas modelo *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*, es decir, comparando las imágenes fotográficas de las semillas en su visión ortogonal plana con una curva cardioide. Se analiza a continuación la forma de las semillas de *L. japonicus* que se ajustan bien a una cardioide sin modificar mientras que para las semillas de *M. truncatula* el ajuste es mejor al modificar la cardioide escalándola en el eje vertical por un factor igual a  $\phi$ . (figura 48 A y 48 B).



A



B

Figura 48.- Ajuste de las semillas de *Lotus japonicus* a una cardioide sin modificar (A) y semillas de *Medicago truncatula* con una cardioide alargada en el eje Y por un factor de  $\phi$ .

## 2.2 Comparación entre variedades y mutantes de *Lotus japonicus*

La tabla 42 presenta un resumen de los resultados de los experimentos llevados a cabo con *Lotus japonicus*. Se presentan los valores medios (y desviación típica) para el área, el índice de circularidad y el índice J en las variedades y genotipos estudiados. Se han analizado 90 semillas secas y 35 semillas embebidas por genotipo.

	Tipos Silvestres		Mutantes		
	MG-20	Gifu	<i>enigma-1</i>	<i>Ljetr-1</i>	<i>Ljhar-1</i>
<b>Área</b>					
Semillas secas	1,6 (0,15)	1,5 (0,14)	1,5 (0,17)	1,3 (0,16)	1,3 (0,13)
Semillas embebidas	3,8 (0,66)	3,2 (0,45)	3,1 (0,43)	2,6 (0,31)	2,8 (0,49)
<b>Índice de Circularidad</b>					
Semillas secas	0,82 (0,03)	0,82 (0,03)	0,82 (0,03)	0,82 (0,03)	0,82 (0,02)
Semillas embebidas	0,86 (0,02)	0,85 (0,02)	0,85 (0,02)	0,85 (0,02)	0,86 (0,01)
<b>Índice J</b>					
Semillas secas	92,7 (1,87)	92,6 (1,78)	90,9 (3,49)	92,6 (2,39)	91,5 (2,32)
Semillas embebidas	93,5 (3,22)	90,9 (2,81)	89,8 (2,28)	88,5 (1,85)	92,4 (2,32)

Tabla 42.- Media de los valores del área (mm<sup>2</sup>), Índice de circularidad e Índice J para semillas de *Lotus japonicus* secas y embebidas en distintos genotipos. Entre paréntesis la desviación típica.

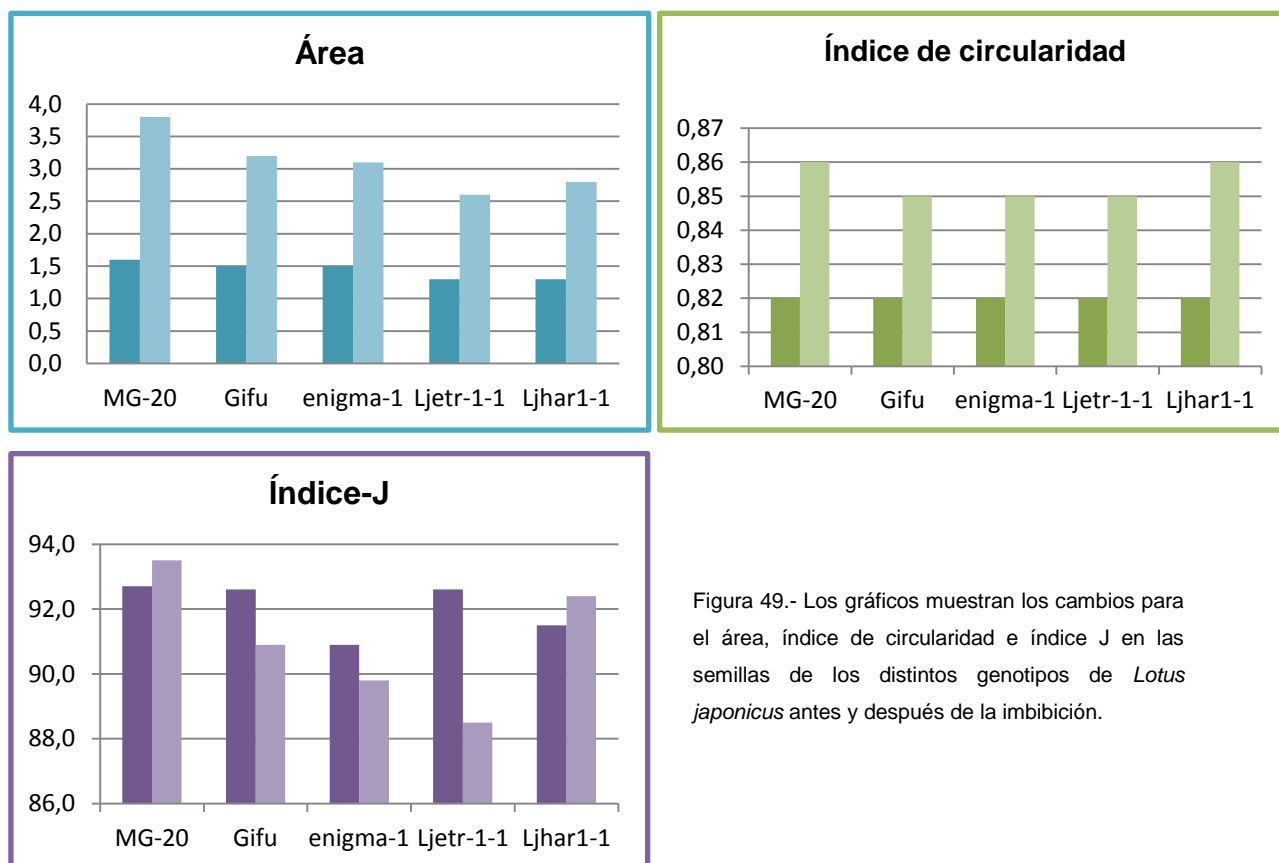


Figura 49.- Los gráficos muestran los cambios para el área, índice de circularidad e índice J en las semillas de los distintos genotipos de *Lotus japonicus* antes y después de la imbibición.

### 2.2.1 Comparación entre variedades

Se han comparado las variedades Gifu y MG-20.

Las semillas de Gifu son más pequeñas que las de MG-20, tanto en estado seco como después de la imbibición (tabla 43, figura 50). En cuanto al ajuste de las semillas de *Lotus* a una curva cardioide no modificada, índice J, no hay diferencia entre las semillas secas de Gifu (92,6) y MG-20 (92,7) sin embargo después de la imbibición, el índice J es menor en Gifu (90,9) que en la variedad MG-20 (93,5). Para el índice de circularidad no se encuentran diferencias entre GIFU y MG-20 ni para las semillas secas ni después de la imbibición.

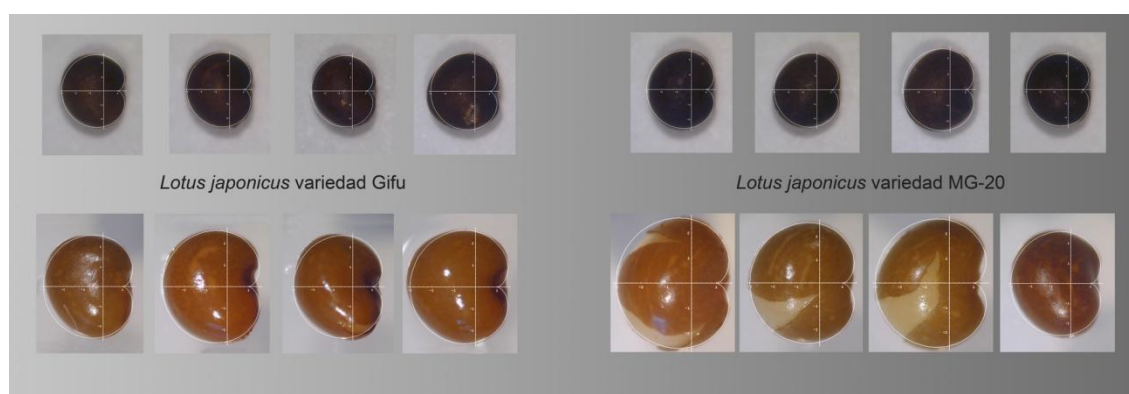


Figura 50.- Ajuste de las semillas a una curva cardioide en las dos variedades de *Lotus japonicus* antes y después de la imbibición.

Estadísticos de grupo						
	Genotipo	Número semillas	Media	Desviación típica	Error típico de la media	P. sig. (bilateral)
<b>Área</b>						
Semillas secas	Gifu	94	1,46	0,14	0,01	0,00
	MG-20	89	1,56	0,15	0,02	
Semillas embebidas	Gifu	43	3,16	0,45	0,07	0,00
	MG-20	32	3,81	0,66	0,12	
<b>Circularidad</b>						
Semillas secas	Gifu	94	0,82	0,03	0,00	0,42
	MG-20	89	0,82	0,03	0,00	
Semillas embebidas	Gifu	43	0,85	0,02	0,00	0,11
	MG-20	32	0,86	0,02	0,00	
<b>Índice J</b>						
Semillas secas	Gifu	30	92,64	1,78	0,33	0,82
	MG-20	30	92,74	1,87	0,34	
Semillas embebidas	Gifu	43	90,94	2,82	0,43	0,00
	MG-20	32	93,52	3,23	0,57	

Tabla 43.- Comparación entre las variedades Gifu y MG-20. Prueba t de Student.

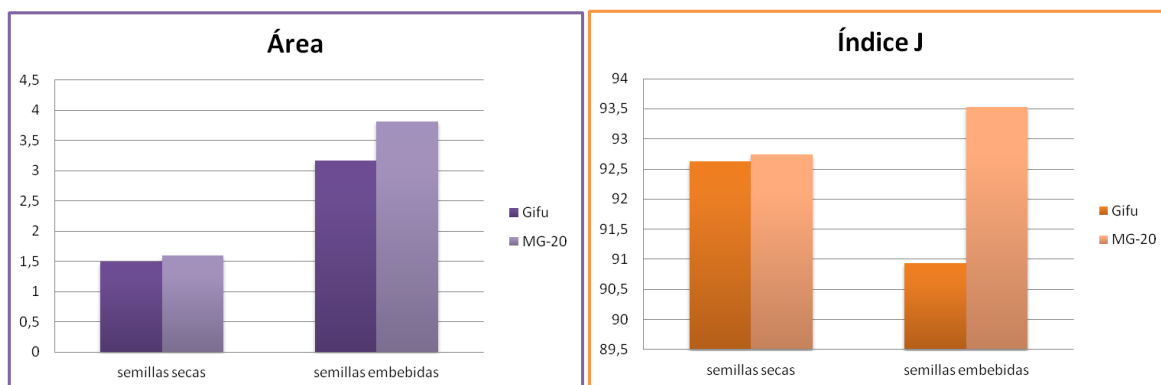


Figura 51.- Representación gráfica del área e índice J entre las dos variedades de *Lotus japonicus* estudiadas.

## 2.2.2 Comparación entre cada variedad y sus genotipos mutantes

Se ha comparado el tamaño y la forma de las semillas en los genotipos Gifu, *Ljetr1-1*, *Ljhar1-1*, MG-20 y *enigma-1* siendo MG-20 el fondo genético para *enigma-1*, y Gifu el fondo genético para *Ljetr1-1* y *Ljhar1-1*.

### Semillas secas

El ANOVA de un factor para el área (tabla 44 izquierda), índice J (tabla 44 derecha) e índice de circularidad (tabla 44 debajo) en las semillas secas entre los distintos genotipos, reveló diferencias para el área e índice J pero no para el índice de circularidad.

	Área					Índice J				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,574	4	1,143	50,97	<b>,000</b>	84,24	4	21,06	3,495	<b>,009</b>
Intra-grupos	9,153	408	0.022			879,7	146	6,025		
Total	13,72	412				963,93	150			

	Índice de circularidad				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,0005	4	0,0001	0,2467	<b>,911</b>
Intra-grupos	0,2407	408	0,0005		
Total	0.2413	412			

Tabla 44.- Resultados de ANOVA para el área, índice J e índice de circularidad en semillas secas de los distintos genotipos de *Lotus japonicus*.



La tabla 45-A muestra los resultados del análisis *post hoc*, comparando las áreas de semillas secas. Las semillas de Gifu son más grandes que las del mutante *Ljhar1-1*.

Las semillas procedentes de los mutantes en la ruta del etileno, en las dos variedades, son más pequeñas que las semillas procedentes de las plantas de tipo silvestre, es decir, las semillas de *Ljetr1-1* son más pequeñas que las semillas de Gifu, y las de *enigma-1* más pequeñas que las de MG-20. No se detectaron diferencias en los valores del índice de circularidad entre las variedades de tipo silvestre o entre cada una de las variedades y sus mutantes respectivos (ANOVA no mostrado). En cuanto a la forma sí hay diferencias significativas, el índice J es menor en *enigma-1* que en MG-20 (tabla 45-B, fig. 26), pero no se encontraron diferencias para *Ljhar1-1* y *Ljetr1-1* con su variedad parental (Gifu).

(A) Área					(B) Índice J			
Genotipo	N	Subconjunto para alfa = .05			Genotipo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2	3			1	2
<i>Ljhar1-1</i>	94	1,3			<i>enigma-1</i>	31	90,90	
<i>Ljetr1-1</i>	92	1,3			<i>Ljhar1-1</i>	30	91,49	91,49
Gifu	94		1,5		<i>Ljetr1-1</i>	30		92,60
<i>enigma-1</i>	95		1,5		Gifu	30		92,63
MG-20	89			1,6	MG-20	30		92,74
Sig.		,524	,994	1,0	Sig.			

Tabla 45.- ANOVA para el área (A) y el índice J (B) en semillas secas de los genotipos de *Lotus japonicus*. El test de Tuckey muestra las diferencias entre los genotipos.

### Semillas embebidas

Se encontraron diferencias entre las semillas embebidas de los distintos genotipos tanto en el área como en el índice J, pero no en el índice de circularidad (tabla 46).

	Área					Índice J				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6,233	4	1,558	6,941	,000	510,89	4	127,72	19,32	,000
Intra-grupos	14,81	66	0,224			1057,43	160	6,608		
Total	21,05	70				1568,33	164			

	Índice de circularidad				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,002	4	0,0006	2,138	,09
Intra-grupos	0,021	66	0,0003		
Total	0,024	70			

Tabla 46.- Resultados de ANOVA para el área, índice J e índice de circularidad en semillas embebidas de los distintos genotipos de *Lotus japonicus*.

Las semillas de Gifu son mayores que su genotipo mutante *Ljetr1-1* (tabla 47 A). Las semillas de la variedad MG-20 son mayores que las del mutante *enigma-1*.

Después de imbibición, los valores del índice J fueron menores para los genotipos mutantes en la ruta de del etileno: *enigma-1* tuvo valores menores que MG-20, y *Ljetr1-1* menores que Gifu (tabla 47 B). No se observaron diferencias entre Gifu y *Ljhar1-1*.

(A) Área

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
<i>Ljetr1-1</i>	33	2,63		
<i>Ljhar1-1</i>	31	2,84	2,84	
<i>enigma-1</i>	26		3,15	
Gifu	43		3,16	
MG-20	32			3,81
Sig.		,574	,135	1,00

(B) Índice J

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
<i>Ljetr1-1</i>	33	88,5			
<i>enigma-1</i>	26	89,8	89,8		
Gifu	43		90,9	90,9	
<i>Ljhar1-1</i>	31			92,4	92,4
MG-20	32				93,5
Sig.		,394	,510	,299	,517

Tabla 47.- ANOVA para el área (A) y el índice J (B) en semillas después de 24 horas de imbibición de los genotipos de *Lotus japonicus*. El test de Scheffé muestra diferencias entre los genotipos.

### 2.2.3 Comparación entre las semillas secas y embebidas

El área y el índice de circularidad aumentaron en todas las variedades y genotipos con la imbibición de la semilla (tabla 42).

El índice J se redujo con la imbibición en los genotipos *Ljetr1-1* y Gifu ( $P < 0,05$ ). No se detectaron diferencias en la variedad MG-20 ni en los mutantes *Ljhar1-1* y *enigma-1*.

### 2.2.4 Comparación de semillas secas de MG-20 con el mutante *beyma* insensible a ABA

La comparación de semillas de la variedad MG-20 con las del mutante *beyma* (insensible al ácido abscísico), muestra que las semillas del genotipo *beyma* son más pequeñas que las de MG-20. No hay diferencias ni para el índice de circularidad ni para el índice J entre ambos genotipos (tabla 48).

	Genotipo	N	Media	Desviación típica.	Error típico de la media	P sig. bilateral
Área	MG-20	18	1,38	,112	,026	,001
	<i>beyma</i>	18	1,25	,098	,023	
Índice de circularidad	MG-20	18	,87	,008	,002	,504
	<i>beyma</i>	18	,87	,010	,002	
Índice J	MG-20	18	92,5	1,54	,364	,218
	<i>beyma</i>	18	91,7	2,04	,480	

Tabla 48.- Prueba t de Student para el área, índice de circularidad e índice J entre los dos genotipos en las semillas secas.

## 2.3 Comparación entre variedades y mutantes de *Medicago*

Para el ajuste de las semillas de *Medicago*, se modificó la forma de la cardioide multiplicando por  $\phi$  el valor de las ordenadas de cada punto (elongación a lo largo del eje vertical).

### 2.3.1 Comparación de la variedad A17 de *M. truncatula* con su mutante *sickle*.

#### Semillas secas

En las semillas secas encontramos diferencias entre los dos genotipos para el área y para el índice de circularidad y no se encontraron para el índice J (tabla 49).

Semillas secas	variedad	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media	P
Área	A17	40	5,28	0,80	0,137	0,005
	<i>Sickle</i>	41	4,67	1,07	0,167	
Índice J	A17	40	87,1	3,77	0,596	0,230
	<i>Sickle</i>	41	86,0	4,14	0,647	
Circularidad	A17	40	0,72	0,02	0,003	0,009
	<i>Sickle</i>	41	0,70	0,03	0,006	

Tabla 49.- Prueba t-Student para ver diferencias entre los dos genotipos en las semillas secas.

#### Semillas embebidas

Después de imbibición, no se observaron diferencias entre los dos genotipos de *Medicago*, para ninguna de las variables estudiadas (tabla 50).

Semillas embebidas	variedad	N	Media	Desviación típica.	Error típico. de la media	P
Área	A17	29	10,09	1,87	0,347	0,085
	<i>Sickle</i>	26	9,11	2,25	0,442	
Índice J	A17	29	86,8	3,44	0,638	0,662
	<i>Sickle</i>	26	86,4	3,56	0,699	
Circularidad	A17	29	0,697	0,02	0,004	0,098
	<i>Sickle</i>	26	0,685	0,03	0,006	

Tabla 50.- Prueba t-Student comparando los dos genotipos en las semillas después de imbibición.

### 2.3.2 Comparación entre las semillas secas y embebidas

La imbibición dio como resultado un aumento de las áreas y una reducción en los valores del índice de circularidad en los dos genotipos. No hubo ningún cambio en el índice J (tabla 51).

		tratamiento	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media	P
A17	Área	Sem. secas	40	5.28	0.80	0.13	0.00
		Sem. embebidas	29	10.09	1.87	0.35	
	Índice J	Sem. secas	40	87.1	3.77	0.60	0.74
		Sem. embebidas	29	86.8	3.44	0.64	
	Circularidad	Sem. secas	40	0.72	0.02	0.00	0.00
		Sem. embebidas	29	0.70	0.02	0.00	
Sickle	Área	Sem. secas	41	4.67	1.07	0.17	0.00
		Sem. embebidas	26	9.11	2.26	0.44	
	Índice J	Sem. secas	41	86.0	4.14	0.65	0.72
		Sem. embebidas	26	86.4	3.56	0.70	
	Circularidad	Sem. secas	41	0.70	0.04	0.01	0.03
		Sem. embebidas	26	0.69	0.03	0.01	

Tabla 51.- Prueba t-Student para ver diferencias entre las semillas secas y después de la imbibición.

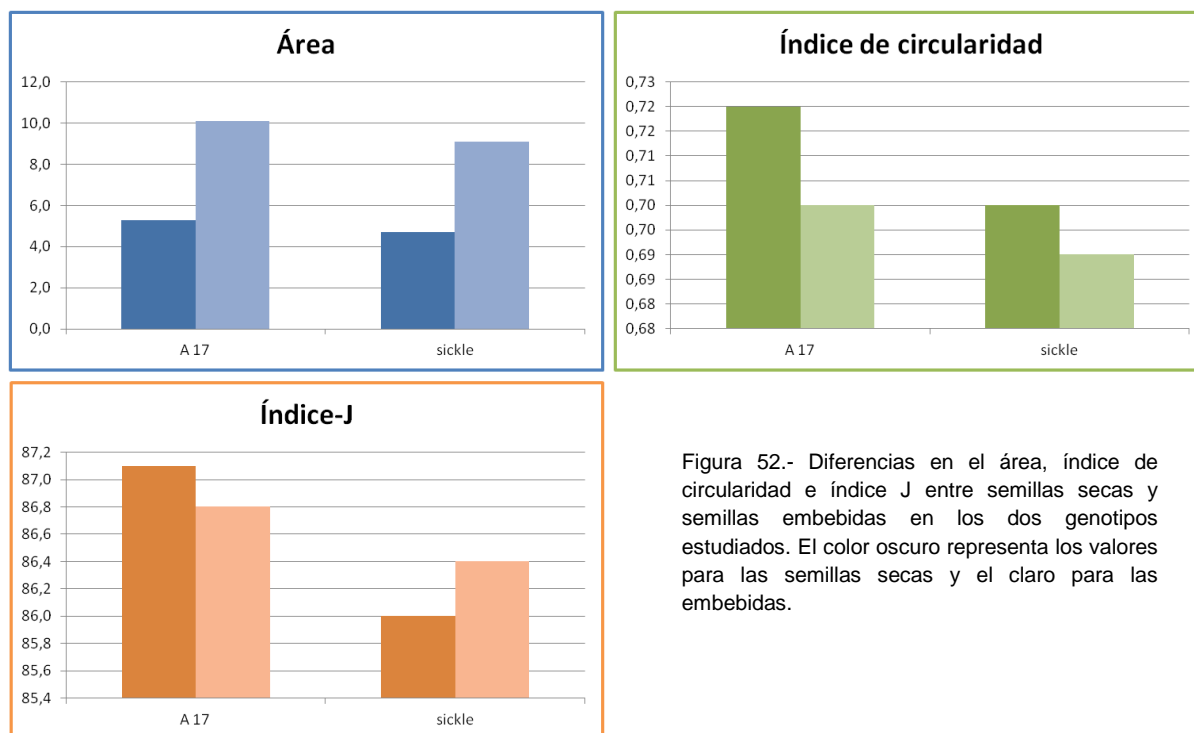


Figura 52.- Diferencias en el área, índice de circularidad e índice J entre semillas secas y semillas embebidas en los dos genotipos estudiados. El color oscuro representa los valores para las semillas secas y el claro para las embebidas.



### 3. *Capparis spinosa*





### 3.1. Modelo basado en la curva cardioide

El género *Capparis*, familia *Capparaceae*, pertenece al orden brasicales al igual que *Arabidopsis*. La forma de las semillas de la especie *Capparis spinosa* se analiza mediante la comparación de sus imágenes con la curva cardioide en las dos subespecies descritas subsp. *Spinosa* y subsp. *Rupestris* (Sm.) Nyman (Highton y Akeroyd, 1991). Tomando como referencia los trabajos anteriores hemos comparado las imágenes fotográficas de las semillas en su visión ortogonal plana con una curva cardioide sin modificar. Según el ajuste de la semilla a la cardioide se han descrito seis tipos básicos de semillas llamados A, B, C, D, E y 0 (cero). Las semillas del tipo A son las que tienen un índice J igual o mayor de 95. Los otros tipos se han definido por los valores del índice J en cada uno de los cuatro cuadrantes. Semillas del tipo B son aquellas en las que en el primer cuadrante Q1 (superior derecho), el índice J es inferior a 90; en los tipos C, D y E los valores del índice J en los cuadrantes Q2, Q3 y Q4 son menores de 90 respectivamente (figura 53).

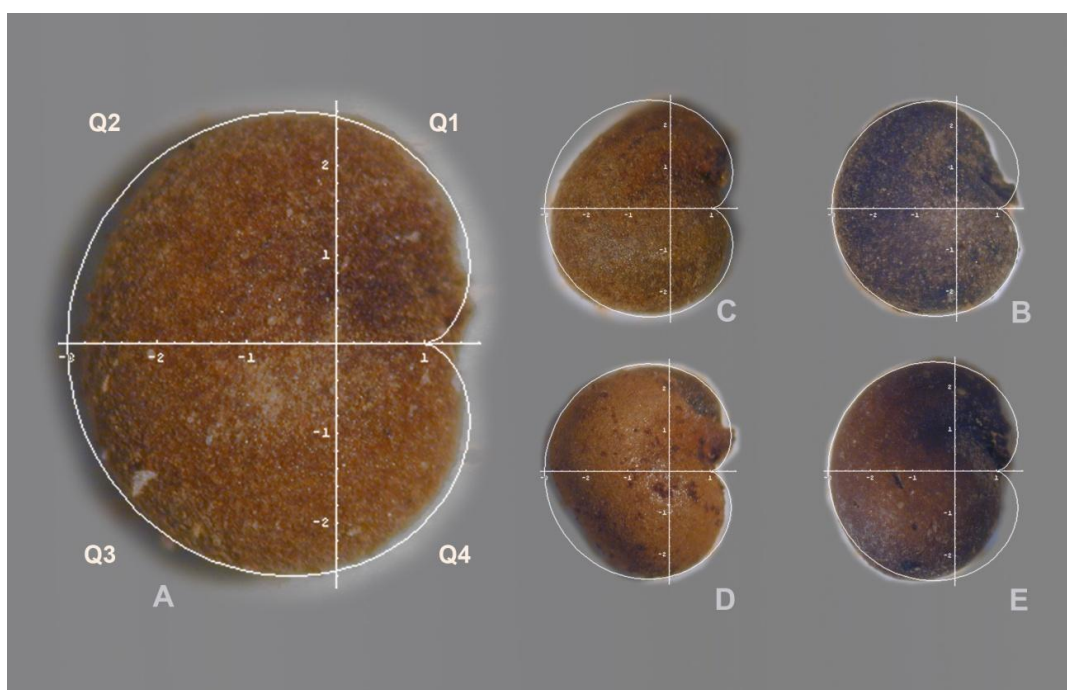


Figura 53.- Ajuste de la curva cardioide a las semillas de *Capparis spinosa*. Tipos de semillas definidos según el porcentaje de ajuste con una curva cardioide. Tipo A, cuando el ajuste supera el 95% en toda la semilla (índice  $J > 95$ ). Tipos B a E, definidos según el ajuste en cada cuadrante., en (Tipo B, índice  $J < 90$  en Q1; Tipo C, índice  $J < 90$  en Q2; tipo D, índice  $J < 90$  en Q3; Tipo E, índice  $J < 90$  en Q4).

El tipo cero es aquel en el cual el índice J de la semilla está por debajo de 95 pero el índice J en todos los cuadrantes es mayor o igual a 90. Es decir, es el tipo al que corresponden las semillas que no son ni A ni B, ni C, ni D ni E.

Exceptuando las semillas tipo cero que no pueden pertenecer a ningún otro tipo, el resto de semillas pueden pertenecer a la vez a más de un tipo básico de los definidos, así podemos encontrar semillas tipo AB, AC, BCE, etc.,... Se tienen así un total de 33 ( $2^5$  más el tipo 0) posibles tipos diferentes.

El estudio se ha llevado a cabo sobre un total de cien semillas recogidas en 10 poblaciones distintas (10 semillas por población; ver mapa, página 73) de las que 50 pertenecen a la subsp. *Rupestris* y 50 a la subsp. *Spinosa*. Es destacable que las cien semillas, elegidas aleatoriamente, corresponden a 14 tipos, es decir menos de la mitad de los definidos como posibles.

En la tabla 52 podemos ver un resumen de los resultados obtenidos para la comparación de las poblaciones en área, índice J (de toda la semilla) e índice J de los cuadrantes.

<b>A</b>						
Subespecie <i>Rupestris</i>						
	CHT	HOU	GEM	OZ	GHO	Mean
Área	6,1 (0,87)	8,4 (1,74)	6,0 (1,27)	5,9 (0,87)	7,6 (0,94)	6,8 (1,53)
Índice J	93,4 (2,17)	92,9 (3,16)	94,0 (2,45)	92,8 (3,61)	91,9 (2,84)	93,0 (2,86)
J(Q1)	90,8 (2,94)	85,5 (8,36)	91,0 (2,24)	82,9(13,21)	83,7 (7,86)	86,8 (8,43)
J(Q2)	94,1 (4,81)	95,1 (1,99)	95,9 (3,31)	96,1 (3,75)	96,3 (1,75)	95,5 (3,28)
J(Q3)	97,0 (1,89)	96,3 (2,35)	95,3 (2,84)	96,4 (1,77)	92,9 (5,60)	95,6 (3,40)
J(Q4)	88,9 (8,53)	85,4 (9,99)	89,5 (6,61)	87,1 (9,52)	84,6 (9,42)	87,1 (8,73)

<b>B</b>						
Subespecie <i>Spinosa</i>						
	CHO	JOU	CHE	BUL	BEJA	Mean
Área	9,1 (1,23)	9,6 (2,80)	9,6 (0,86)	9,6 (1,35)	9,8 (1,56)	9,5 (1,64)
Índice J	93,3 (2,98)	91,8 (5,21)	90,8 (2,96)	93,3 (1,69)	93,5 (2,74)	92,5 (3,4)
J(Q1)	86,1 (4,51)	80,3 (9,45)	71,6 (10,4)	87,1 (6,61)	83,5 (5,65)	81,7 (9,3)
J(Q2)	96,1 (3,30)	95,2 (4,08)	94,4 (2,58)	96,4 (1,65)	95,5 (3,52)	95,5 (3,1)
J(Q3)	97,4 (1,15)	95,5 (3,76)	94,5 (3,15)	94,7 (2,73)	96,0 (2,39)	95,6 (2,9)
J(Q4)	85,0 (11,2)	86,7 (8,51)	92,0 (3,73)	89,4 (6,99)	90,7 (5,24)	88,8 (7,7)

Tabla 52.- Resumen de los resultados. Valores medios y (desviación típica) para área, índice J y para el índice J de los cuadrantes Q1, Q2, Q3 y Q4. A) subespecie *Rupestris*. B) subespecie *Spinosa* (ver figura 56).

### 3.2. Tamaño de las semillas

Las semillas de *C. spinosa* subsp. *Spinosa* son más grandes que las semillas de *C. spinosa* subsp. *Rupestris* (tabla 53). Los valores medios para sus áreas fueron de 9,5 y 6,8 mm<sup>2</sup> respectivamente.

subespecie	Nº	Media	Prueba de Levene (igualdad de varianzas)		Prueba T (igualdad de medias)	
			F	sig.	sig. bilateral	dif. de medias
<i>Rupestris</i>	50	6,8 (1,53)	0,014	0,908	0	2,73
<i>Spinosa</i>	50	9,5 (1,54)				

Tabla 53.- Prueba t de Student para el área de las semillas entre subespecies.

Al comparar el área de las semillas entre las distintas poblaciones mediante ANOVA de un factor, se obtuvo el resultado de la tabla 54.

	Área				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	sig.
Inter-grupos	240,74	9	26,74	12,513	,000
Intra-grupos	192.39	90	2,138		
Total	433.139	99			

Tabla 54.- Anova para el análisis del área de las semillas por población

El análisis *post hoc* reveló diferencias entre las semillas de *Rupestris* recogidas en distintas poblaciones. Las semillas de Oued Zayied, Gar el Melh y Chemtou son más pequeñas (5,9 - 6,0 y 6,1 mm<sup>2</sup> respectivamente) que las recogidas en Houmana (8,4 mm<sup>2</sup>). Entre las semillas de la subespecie *Spinosa* no se encontraron diferencias (tabla 55, figura 54).

Región	Nº. semillas	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
OZ	10	5,90		
GEM	10	5,98		
CHT	10	6,13		
GHO	10	7,61	7,61	
HOU	10		8,42	8,42
CHO	10		9,10	9,10
BUL	10		9,57	9,57
JOU	10		9,59	9,59
CHE	10		9,65	9,65
BEJA	10			9,80
Sig.		,243	,070	,521

Tabla 55.- Test *post hoc* después de ANOVA para el área de las semillas por población.

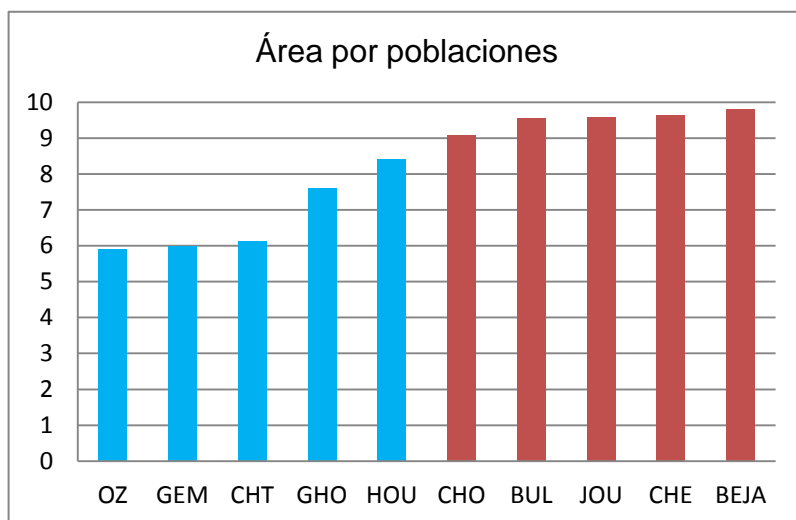


Figura 54.- Área media de las semillas en cada población en mm<sup>2</sup>. En azul las poblaciones de la subespecie *Rupestris* y en rojo las de *Spinosa*.

### 3.3. Forma de las semillas.

En las semillas analizadas el índice J está comprendido entre 83,5 y 97,9. El valor medio es 92,8. No se encontraron diferencias para el índice J entre subespecies (tabla 56; el valor medio para *Spinosa* es de 92,5 y para *Rupestris* de 93,0), ni entre poblaciones (tabla 57).

subespecie	Nº	Media	Prueba de Levene (igualdad de varianzas)		Prueba T (igualdad de medias)	
			F	sig	sig. Bilateral	dif. de medias
<i>Rupestris</i>	50	93,0(2,86)	0,849	0,359	0,45	0,46
<i>Spinosa</i>	50	92,5(3,35)				

Tabla 56.- Comparación del índice J (t-Student) para las dos subfamilias.

	Índice J				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	85,164	9	9,446	0,9744	,466
Intra-grupos	872,488	90	9,694		
Total	957,504	99			

Tabla 57.- ANOVA de un factor para el índice J entre las distintas poblaciones.

De las cien semillas analizadas, 28 pertenecen al tipo A (figuras 55 y 56, tabla 37); de ellas encontramos 15 en *Rupestris* y 13 en *Spinosa*. Todas las poblaciones tienen alguna semilla del tipo A excepto la de Chemtou (figura 56).

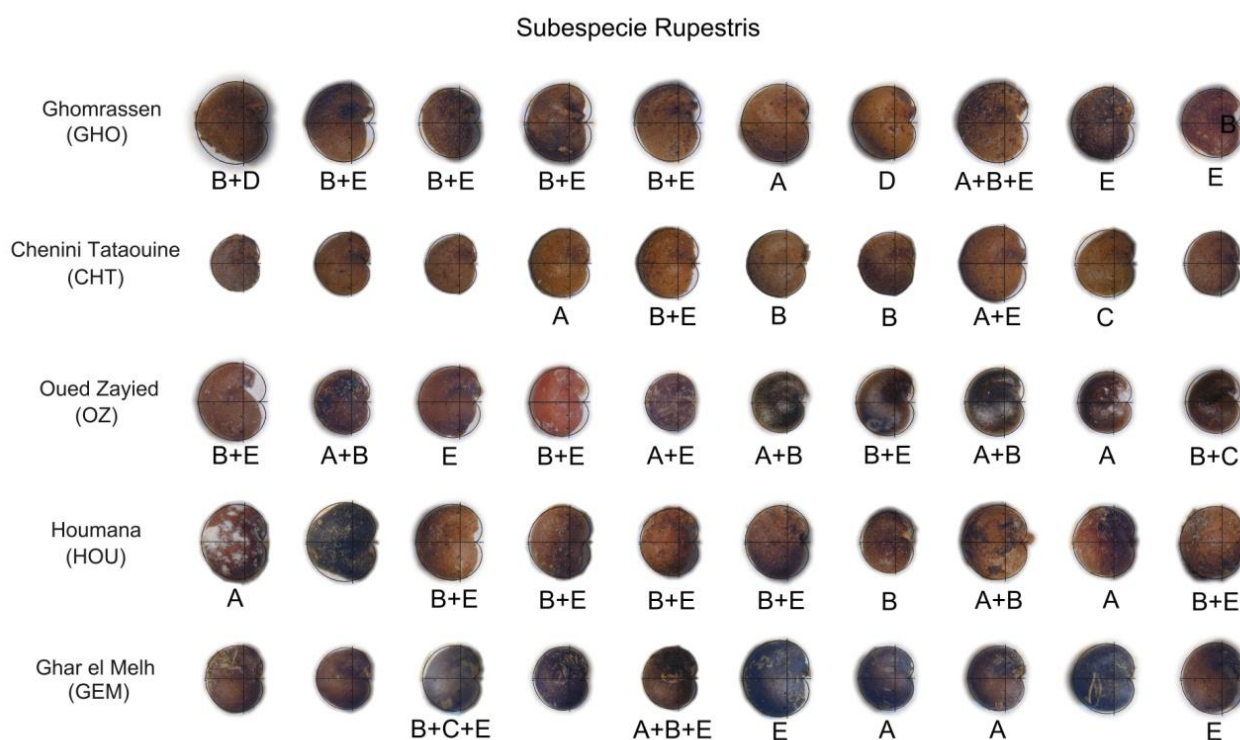


Figura 55.- Semillas de *Capparis spinosa* subespecie *Rupestris* analizadas.

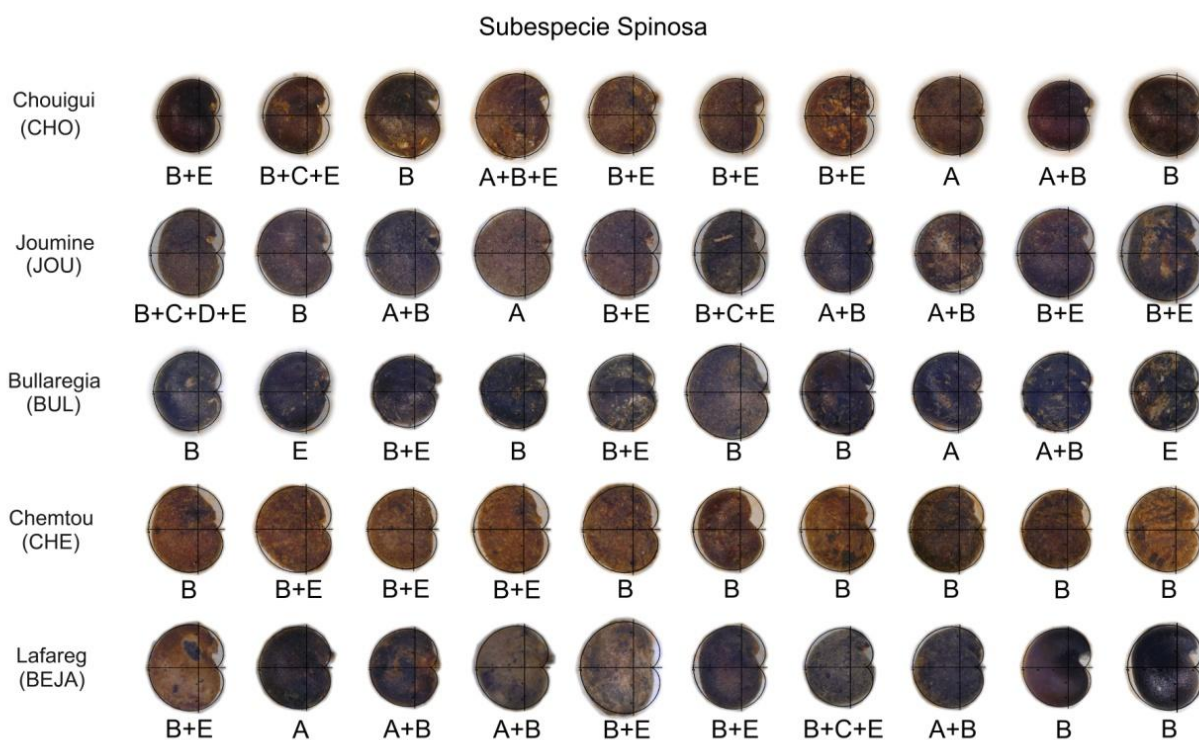


Figura 56.- Semillas de *Capparis spinosa* subespecie *Spinosa* analizadas.

La división de la imagen de la semilla en cuatro sectores nos permite obtener cuatro datos por semilla que corresponden al ajuste de la cardioide en cada sección. Centramos el análisis morfológico en cada sector de la semilla.

Al comparar el índice J de los cuadrantes de las semillas mediante ANOVA de un factor, se obtuvo el resultado de la tabla 58.

	Índice J				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9619,906	3	3206,6	74,61	0,000
Intra-grupos	17018,05	396	42,975		
Total	26637,96	399			

Tabla 58.- ANOVA de un factor para ver las diferencias en el índice J entre los distintos cuadrantes.

El análisis *post hoc* reveló que los valores para el índice J en los cuadrantes de la derecha (Q1 y Q4) fueron menores (medias de: 84,2 y 87,9) y más variables (desviación

estándar de 9,2 y 8,2) que los cuadrantes del lado izquierdo (Q3 y Q4; medias: 95.5 y 95.6; desviación estándar: 3.2 y 3.1 respectivamente). En consecuencia encontramos más semillas de los tipos B y E que de los tipos C o D (tabla 61, figuras 55 y 56).

cuadrante	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
Q1	100	84,252		
Q4	100		87,928	
Q2	100			95,509
Q3	100			95,585
Sig.		1,000	1,000	1,000

Tabla 59.-Diferencias en el índice J entre los cuadrantes de la figura.

Para los valores del índice J en el primer cuadrante (Q1) hay diferencias entre las dos subespecies. La media para *Rupestris* es de 86.8 mientras que para *Spinosa* es de 81.7 (tabla 60). En los cuadrantes Q2, Q3 y Q4 no se encontraron diferencias.

subespecie	Nº	Media	Prueba de Levene (igualdad de varianzas)		Prueba T (igualdad de Medias)	
			F	sig	Sig. Bilateral	Dif. De medias
<i>Rupestris</i>	50	86,8				
<i>Spinosa</i>	50	81,7			0,005	5.059

Tabla 60.- Comparación (t-Student) de los valores del índice J para el cuadrante 1 (Q1) entre las dos subespecies.

En la subespecie *Rupestris* encontramos que, de las 50 semillas analizadas, 17 no pertenecían al tipo B o E. En *Spinosa* fueron 4 las semillas que no pertenecían a uno de estos dos tipos (figura 56).

La tabla 61 y la figura 57 presentan un resumen de la distribución de los tipos morfológicos en las dos subespecies.

A

	Tot. A	Tot. B	Tot. C	Tot. D	Tot. E	0
<i>Rupestris</i>	15	26	3	2	23	8
<i>Spinosa</i>	13	44	4	1	22	0
Total	28	70	7	3	45	8

B

A (Índice J > 95)					No A (Índice J < 95)									
	A	AB	ABE	AE	0	B	BC	BD	BE	BCE	BCDE	C	D	E
<i>Rupestris</i>	7	4	2	2	8	4	1	1	13	1	0	1	1	5
<i>Spinosa</i>	4	8	1	0	0	16	0	0	15	3	1	0	0	2
Total	11	12	3	2	8	20	1	1	28	4	1	1	1	7

Tabla 61. - A) Número de semillas por cada uno de los tipos morfológicos básicos (A, B, C, D, E y 0; ver su descripción en la página 127). La suma de las casillas de la fila Total es mayor que el total de las semillas (50 por genotipo) ya que una misma semilla puede pertenecer a más de un tipo. B) Número de semillas por cada una de las combinaciones observadas con los tipos morfológicos básicos.



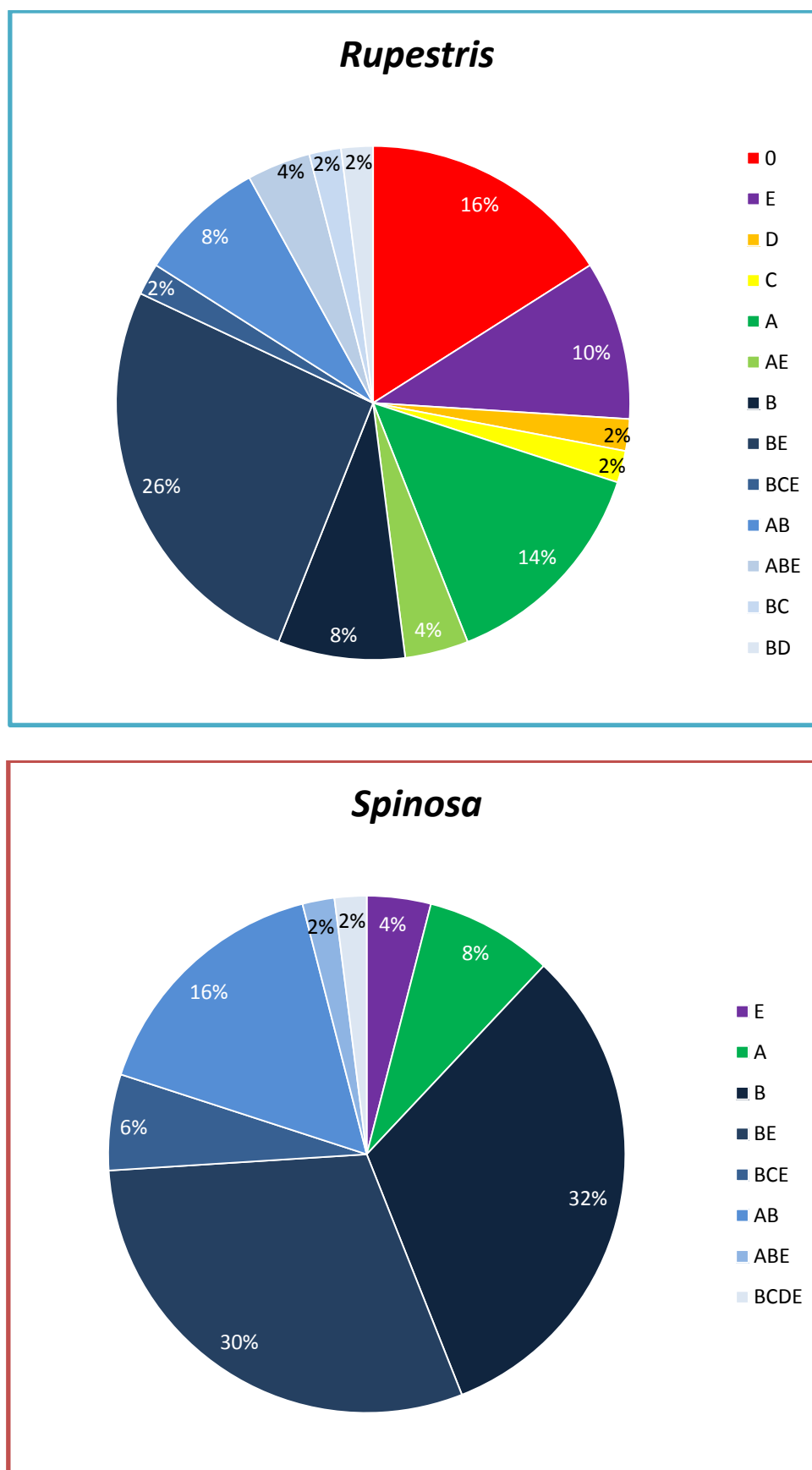


Figura 57.- Tipos de semillas y porcentaje de cada uno de ellos por subespecie.

Al comparar el índice J en los distintos sectores definidos mediante ANOVA de un factor, se obtuvo el resultado de la tabla 62 (sector Q1 arriba izquierda, Q2 arriba derecha, Q3 debajo izquierda, Q4 debajo derecha).

	Sector Q1					Sector Q2				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	280,145	9	311,46	5,075	0,000	56,116	9	6,235	0,59	0,80
Intra-grupos	5523,11	90	61,367			940,63	90	10,45		
Total	8326,25	99				996,75	99			

	Sector Q3					Sector Q4				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	156,40	9	17,377	1,926	0,057	569,66	9	63,296	0,93	0,51
Intra-grupos	811,7	90	9,0192			6157,2	90	68,413		
Total	968,13	99				6726,9	99			

Tabla 62.- Resultados de ANOVA para el índice J por sectores.

Mediante análisis *post hoc* se determinó que la población Chemtou presenta menor índice J en el primer cuadrante (Q1:71,6) que el resto de las poblaciones (excepto Joumine: 80,3 y Oued Zayied: 82,9). Chemtou y Joumine pertenecen a la subsp. *Spinosa*. Para el índice J en el tercer cuadrante (Q3) se encontraron diferencias entre Ghomrassen (92,9) y Chouiqui (97,3). La primera pertenece a la subsp. *Rupestris* y la segunda a *Spinosa* (tabla 63).

Q1				Q3			
N	Región	Subconjunto para alfa = .05		Región	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2		1	2	
10	CHE	71,6		GHO	92,9		
10	JOU	80,3	80,3	CHE	94,5	94,5	
10	OZ	82,9	82,9	BUL	94,7	94,7	
10	BEJA		83,5	GEM	95,3	95,3	
10	GHO		83,7	JOU	95,5	95,5	
10	HOU		85,5	BEJA	95,9	95,9	
10	CHO		86,1	HOU	96,3	96,3	
10	BUL		87,1	OZ	96,3	96,3	
10	CHT		90,8	CHT	97,0	97,0	
10	GEM		91,0	CHO		97,3	
	Sig.	0.053	0.082		Sig.		

Tabla 63.- Resultado del análisis post hoc para el índice J en los diferentes cuadrantes.

Todas las semillas de Chemtou pertenecen al tipo B (figura 56). Este resultado junto a los menores valores para el índice J del primer cuadrante, nos indican diferencias en la morfología de esta población.

Sólo tres de las cien semillas pertenecen al tipo D, una en Joumine (subsp. *Spinosa*) y dos en Ghomrassen (subsp. *Rupestris*).

Ocho de las semillas, todas ellas en tres poblaciones de la subsp. *Rupestris* (Chemtou, Houmena y Ghar El Melh), pertenecen al tipo cero. En ellas el ajuste a la cardioide (índice J) era inferior a 95 pero las similitudes parciales con cada cuadrante de la cardioide eran superiores a 90.



## DISCUSIÓN

---



## 1. Necesidad de una descripción morfológica de las semillas basada en la Geometría

La Morfología es un aspecto central de la Botánica que interacciona con todas sus disciplinas (página 32). La descripción de los grupos taxonómicos, el estudio de sus transformaciones en el tiempo (evolución) y el análisis de los procesos de desarrollo requieren una descripción precisa y cuantitativa de la Morfología. La forma de las plantas expresa la información genética contenida en sus células. El espacio, el volumen, y la superficie interactúan como limitaciones biofísicas con las actividades de genes y proteínas en un complejo proceso de desarrollo. El tamaño y la forma son, en cada momento, el resultado de los procesos de desarrollo en un medio ambiente "estable" o bien ocurren en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Cervantes y Tocino, 2009).

El programa de desarrollo codificado en el genoma de un organismo incluye la posibilidad de responder a alteraciones en las condiciones ambientales mediante un cambio en la forma (plasticidad, adaptación) que es variable según las especies. Un ejemplo clásico, citado ya por Goethe y Lamarck, es el de las hojas del *Ranunculus aquatilis*. En esta planta las hojas que crecen en el agua tienen forma filamentosa, mientras que las que crecen al aire tienen forma aplanada. También se observan las formas intermedias, de transición en hojas que están en la superficie del agua (figura 58), para Goethe esto se debe a la anastomosis de los haces vasculares, las hojas que están sumergidas en el agua no presentan anastomosis y las que están fuera están completamente anastomosadas (Goethe, 1790).



Figura 58.- Ejemplos de adaptación *Ranunculus aquatilis*.

Plantas de la misma especie cambian su forma en respuesta a las condiciones ambientales. Las cepas de *Vitis vinifera* en zonas secas y calurosas son pequeñas y crecen pegadas al suelo, mientras que en zonas húmedas son mayores. En general cualquier planta

que crezca en suelos pobres y se encuentre expuesta a la intemperie alcanzará menor desarrollo que una planta igual en suelo rico en nutrientes y condiciones óptimas de humedad y temperatura. Una cuestión pendiente y de actualidad consiste en estudiar los mecanismos por los cuáles estos casos de adaptación individual o poblacional (plasticidad) se heredarán, dando lugar a cambios poblacionales estables y a nuevas variedades. La Epigenética estudia los cambios heredables no debidos a modificaciones en la secuencia de nucleótidos en el DNA (metilación de bases, acetilación de histonas, alteraciones en la dinámica de microRNAs,...). Estos mecanismos se engloban bajo la denominación general de herencia transgeneracional y, aunque cada vez se conocen mejor sus detalles, por lo general se han asociado más con la frecuencia de la aparición de determinadas mutaciones que con la formación de variedades (Hauser *et al.*, 2011).

En su trabajo titulado *Cultures Experimentales dans les Alpes et les Pyrénées* (1890) Gaston Bonnier analiza los resultados de cultivar múltiples especies de plantas en distintas altitudes, en los Alpes y en los Pirineos. Bonnier en este experimento utiliza 130 especies diferentes pertenecientes a 41 familias entre las que incluye plantas herbáceas, helechos, gramíneas y algún árbol. Las plantas que crecen a altitudes elevadas en general presentan las siguientes características (figura 59):

1. Tamaño más pequeño.
2. Entrenudos más cortos.
3. Mayor desarrollo de las partes subterráneas.
4. Hojas más pequeñas, excepto en la región subalpina.
5. Hojas más gruesas.
6. Un tono verde más intenso en las hojas.
7. Coloración más viva de las flores.

El tratamiento no tiene el mismo efecto en todas las plantas. *Chenopodium bonus-henricus* (*Amaranthaceae*; herbácea anual) y *Thymus serpyllum* (*Lamiaceae*; sub-arbusto), son las plantas en las que el clima alpino tiene menos efecto. En algunos de los árboles estudiados como *Fraxinus excelsior* (*Oleaceae*) o *Betula alba* (*Betulaceae*) el cambio consiste en que las hojas de árboles crecidos en la montaña son más gruesas. Por otra parte entre las plantas que sufren más cambios se encuentran *Lotus corniculatus* (*Fabaceae*), *Helianthus tuberosus* (*Asteraceae*), *Prunella vulgaris* (*Lamiaceae*), *Alchemilla vulgaris* y *Potentilla tormentilla* (*Rosaceae*). En la familia *Lamiaceae* encontramos una especie sobre la que el medio ambiente tiene poco efecto (*Thymus serpyllum*) y otra que sufre cambios más grandes (*Prunella vulgaris*). *Thymus serpyllum* es un subarbusto y *Prunella vulgaris* es una planta herbácea. En general, las plantas que presentan más cambios con la altitud son herbáceas con características de un ciclo vital del tipo r, resultado que sugiere que el tipo r se asocia con una mayor plasticidad fenotípica.





**Fig. 192 a 194. — *Helianthus tuberosus* (Topinambour). P, port de la plante de la station inférieure; M, port de la plante dans la station supérieure (2 300 m.); M', la plante de la station supérieure, moins réduite.**

Figura 59.- Diferencias de porte en la planta de *Helianthus tuberosus*. A la izquierda planta crecida a altitud normal (P); a la derecha, planta crecida en la montaña (2300 m; M, a escala con P y M', aumentada).

El trabajo no incluye una descripción de las semillas, pero invita a preguntarse si estos cambios en respuesta a situaciones ambientales estarán asociados con cambios en la morfología de la semilla.

La forma de los organismos está determinada por factores internos en interacción con estímulos ambientales siendo por tanto el resultado de múltiples interacciones integradas en el metabolismo celular mediante una regulación compleja. Las plantas compensan su incapacidad para moverse con una gran capacidad de respuesta (plasticidad) ante los cambios que se producen en el medio ambiente. La respuesta implica a menudo cambios morfológicos que hay que describir con precisión. Interesa conocer si la forma de la semilla se ve afectada para lo que se necesita acudir a modelos geométricos con métodos cuantitativos.

El criterio para distinguir una especie de otra se basa en su posibilidad de fecundación cruzada: dos individuos de la misma especie pueden reproducirse entre sí pero no así dos individuos de distinta especie. La posibilidad depende de la compatibilidad genética y no siempre estará relacionada con cambios morfológicos. No obstante, la descripción morfológica detallada y cuantificada de los organismos o de alguna de sus estructuras, como por ejemplo las semillas, permite analizar diferencias entre dos organismos pertenecientes al mismo grupo taxonómico o también identificar características distintivas de diferentes grupos.

El análisis morfológico de las semillas en especies modelo presentado en este trabajo proporciona nuevos parámetros útiles para la caracterización morfológica. Esto permite la identificación de los elementos genéticos responsables de la forma de la semilla. Los cambios en la forma ocurren de manera independiente a los cambios en el tamaño. El análisis de la forma es un campo de investigación que se ha mantenido prácticamente sin explorar durante décadas.

La descripción morfológica de las semillas es también un paso necesario para el análisis de la diversidad biológica en las poblaciones naturales, así como un aspecto importante en la taxonomía genética y estudios de biodiversidad. Los métodos modernos en la tecnología de escaneo y algoritmos de análisis de imagen (Herridge *et al.*, 2011; Tanabata *et al.*, 2012) permiten mediciones rápidas de las dimensiones de las semillas en un gran número de muestras, pero desde un punto de vista biológico los métodos cuantitativos pueden aportar más información si se tiene en cuenta la forma de las semillas, es decir, su similitud con las figuras geométricas.

## 2. Descripción morfológica de las semillas mediante la curva cardioide en plantas-modelo: *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*.

El contorno de las imágenes bidimensionales de semillas de *Arabidopsis* describe una curva cuya forma es muy parecida a una cardioide alargada en el eje X (es decir horizontalmente) por un factor de  $\phi$ , la proporción áurea (Cervantes *et al.*, 2010). La forma de las semillas de *Arabidopsis* se parece más a la curva cardioide que a un modelo anterior basado en un esferoide prolato (Robert *et al.*, 2008; figura 38). En trabajos anteriores habíamos utilizado el índice G como medida cuantitativa del ajuste. Esta magnitud, obtenida por semejanza con el índice de circularidad, presenta algunos inconvenientes, como se vio en materiales y métodos (página 82), por lo que en trabajos posteriores se utilizó el índice J (página 83).

En semillas de dos variedades silvestres de *Arabidopsis*, Columbia y Wassilewskija, el valor medio para el índice J es mayor en las semillas embebidas durante 24 horas que en las semillas secas, los valores medios son de 86 para las semillas secas y de 91 para las semillas embebidas. No obstante, el ajuste es mejor en las situaciones intermedias, que tienen lugar entre ambas, durante el curso de la imbibición. En ambas variedades, el índice J asciende hasta valores máximos, (93,1 para Columbia y 95,6 para Wassilewskija), que se alcanzan aproximadamente con una hora y media de imbibición (figura 60; ver también más adelante, página 154).

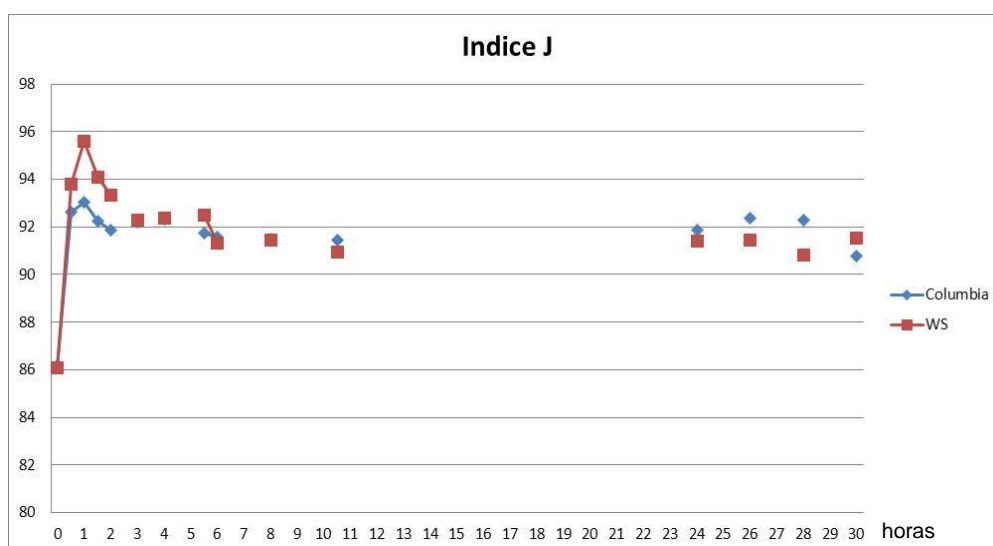


Figura 60.- Representación de los cambios en el índice J durante la imbibición de las semillas de los tipos silvestres de *Arabidopsis*.

El modelo basado en la curva cardioide también es válido para las semillas de leguminosas modelo *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* (Cervantes *et al.*, 2012). Las semillas de *Lotus* son redondeadas y su forma se describe mejor mediante una curva cardioide sin modificar, mientras que para *Medicago*, la cardioide debe ser alargada en un factor de  $\phi$  en la dirección vertical para proporcionar un buen ajuste. Las semillas de *Arabidopsis* y *Medicago* presentan una forma alargada asociada con su crecimiento dentro de las vainas. En *Arabidopsis*, la semilla presenta el micrópilo en un polo y la cardioide es alargada en la dirección horizontal a partir del micrópilo. En *Medicago truncatula*, la vaina toma la forma de una espiral, y la semilla se desarrolla en su interior dejando el micrópilo en posición central, por lo que la cardioide resultante está alargada en dirección vertical. En ambas especies, *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana*, durante el desarrollo de la semilla hay restricciones físicas similares que tienen como resultado un ajuste optimizado modificando la cardioide en un factor de  $\phi$ . Las semillas de *Lotus*, como las de otras muchas leguminosas (soja, guisantes, garbanzos y lentejas) se desarrollan dentro de una vaina alargada, pero son más redondeadas que las de *Medicago* o *Arabidopsis*. Es posible diseñar nuevos modelos geométricos basados en la curva cardioide y adaptados a otras especies de estas familias.

Las especies modelo en las familias leguminosas y crucíferas presentan ciclos vitales con características del tipo r. Para ellas es adecuado el ajuste de la forma de la semilla con modelos sencillos. No se trata de querer establecer arbitrariamente una relación entre la forma (semejanza con una curva cardioide) y el modo de vida (tipo r), sino de constatar que esta relación existe en especies modelo de leguminosas y en *Arabidopsis*. Será interesante ver si este resultado es de aplicación general; es decir, si el ajuste de la forma de las semillas con una curva cardioide es una característica propia o frecuente entre especies cuyo ciclo vital posee características del tipo r. Las familias de plantas han evolucionado a partir de un número reducido de especies. Un ejemplo podemos encontrarlo en la familia *Geraniaceae* (Fiz *et al.*, 2008), cuya diversificación se produjo durante el Mioceno, coincidiendo con un aumento de la aridez en sus áreas de distribución. Un ancestro de la rama más grande de las geraniáceas (*Geranium*, *Erodium* y *California*) colonizó hábitats en el hemisferio norte y en las cadenas montañosas de Sudamérica. La evolución de la familia está marcada por la dispersión desde África meridional hacia hábitats más fríos y templados, donde la polinización generalista y la autogamia facultativa pueden asegurar una producción suficiente de semillas y la supervivencia (Fiz *et al.*, 2008). En la base de este proceso encontramos características propias del tipo r y no parece excesivo generalizar que éstas puedan encontrarse en el origen de la evolución de otras familias. Las formas más complicadas y especializadas no evolucionan hacia más simples sino al revés. Edward Drinker Cope propuso la teoría de la no-especialización que, según Depéret era, a sus ojos, una de las más importantes de la evolución (Depéret, 1929). Como veíamos en la introducción (página 56), las clasificaciones morfológicas de semillas permiten identificar especies asociadas con ambos tipos, r y K y también veíamos que existen familias que contienen especies de cada uno de los dos tipos. En ellas puede ocurrir que aquellas

especies del tipo r, cuyas semillas son más sencillas (llamábamos cuantitativas), hayan sido en el pasado y sean en la actualidad precursoras de las especies del tipo K. Los resultados que se comentarán más adelante en *Capparis* (página 156) apoyan esta posibilidad.

Todas las especies-modelo comparten características importantes (ciclos de vida cortos, semillas pequeñas y abundantes, no tienen formas complejas). Representan ejemplos de organismos del tipo r y, por tanto, simples (Begon *et al.*, 2006). La descripción de sus semillas comparándolas con figuras geométricas derivadas de la curva cardioide mediante transformaciones sencillas puede ser una característica de las plantas modelo. El análisis de la forma de la semillas en especies-modelo de diferentes familias permite revelar hasta qué punto es esto válido.

En tres especies modelo (*Arabidopsis*, *Medicago*, *Lotus*), la forma de la semilla se ajusta a formas geométricas simples: una curva cardioide no modificada o ligeramente modificada. Esto tiene un significado ecológico: Formas geométricas simples se asocian con el ciclo vital de tipo r en plantas modelo permitiendo la aplicación de los métodos descritos a la investigación en otras especies.

### 3. Aplicaciones del método basado en la curva cardiode en sistemas modelo: I. Análisis cuantitativo de la forma en variedades y mutantes: *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*.

#### 3.1. Comparación entre variedades.

En *Arabidopsis* se han comparado las variedades Columbia y Wassilewskija y no se han encontrado diferencias ni en tamaño ni en forma entre las semillas de ambas.

En *Lotus japonicus* se han comparado las variedades Gifu y Miya (MG-20). Las semillas de Miya (MG-20) son más grandes y, después de 24 horas de imbibición, sus valores del índice J (93,5) son mayores que en Gifu (90,9). Para interpretar adecuadamente este resultado sería conveniente conocer el cambio en los valores del índice J a lo largo de la imbibición. En *Arabidopsis* hemos encontrado que los valores aumentan en la primera hora y media para disminuir a continuación (ver más adelante, página 154). Desconocemos cuál es la tendencia en *Lotus japonicus* a lo largo de la imbibición y si, como ocurre en *Arabidopsis* es similar en ambas variedades.

Entre las dos variedades, Gifu y Miya, se han descrito previamente diferencias en su sensibilidad al ABA (Biswas *et al.*, 2009). Aquí, encontramos que MG-20, un ecotipo más tropical y menos sensible al ABA durante la germinación que Gifu, tiene semillas más grandes y cuya forma cambia menos en el curso de la imbibición, lo que sugiere que, en *L. japonicus* puede existir una relación entre el tamaño de la semilla, la latitud de origen y la sensibilidad al ABA. Una relación inversa entre el tamaño de la semilla y la latitud se describió para las plantas en general por Moles *et al.* (2007), así como dentro de la familia de las leguminosas para las semillas de las especies del género *Glycine* en Australia (Murray *et al.*, 2003). Queda por verificar la posible relación entre el tamaño y la sensibilidad al ABA, pero cabe considerar que la sensibilidad a hormonas sea, por lo general, mayor en aquellas regiones separadas del Ecuador en las que es más notable el cambio estacional que en plantas del Ecuador y los trópicos. Por último, la insensibilidad al ABA en determinadas variedades puede implicar un retraso en la abscisión y la maduración de las vainas dando como resultado semillas más grandes.

Para obtener detalles más precisos del cambio en la forma durante la imbibición e investigar su relación con la sensibilidad al ABA, se pueden realizar análisis mediante modelos de regresión curvilínea como los aplicados en este trabajo a *Arabidopsis*. Esto permitirá, entre otras cosas, comprobar si el cambio en la forma durante la imbibición, que como veíamos es más notable en Gifu, tiene relación con la sensibilidad al ABA.

### 3.2. Mutantes en la ruta del etileno en *Arabidopsis*

El etileno, el ácido abscísico (ABA) y otras hormonas intervienen en la regulación de los procesos del desarrollo en las plantas (Taiz and Zeiger, 2006). Alteraciones de la forma en mutantes en la ruta de señalización del etileno nos pueden indicar detalles de la acción de las hormonas en dichos procesos.

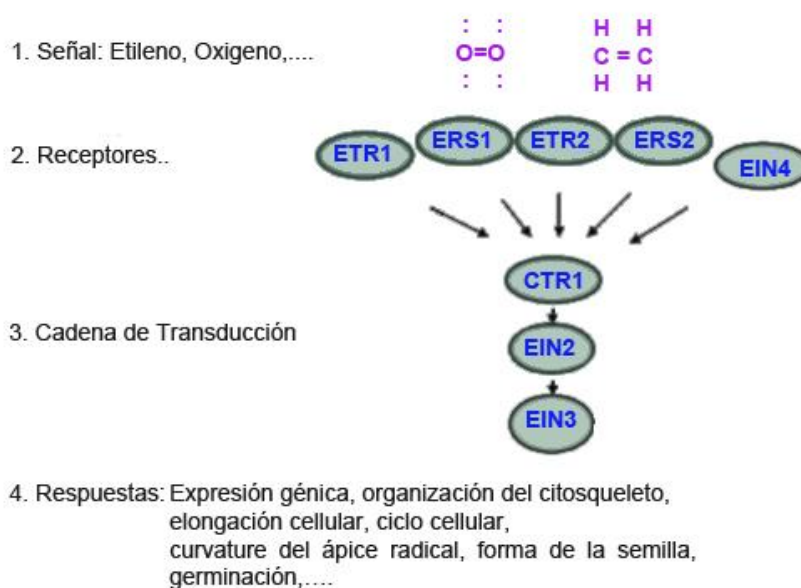


Figura 61.- Ruta de señalización del etileno.

La ruta de señalización del etileno en plantas afecta a varios aspectos del desarrollo tales como organización del citoesqueleto, ciclo celular y múltiples aspectos de metabolismo (Abeles *et al.*, 1992; Baluska *et al.*, 1993; figura 61). Siendo un proceso que interviene en la regulación general, la ruta del etileno debe poseer sistemas eficientes para modular las actividades de sus mecanismos efectores en respuesta a cambios ambientales.

Las proteínas participantes en la ruta de señalización del etileno no sólo están relacionadas con la detección de etileno, sino también con otros mecanismos de control más generales (Cervantes, 1998). Esta afirmación se apoya en la evidencia experimental obtenida a partir de múltiples fuentes.

En primer lugar, la unión del etileno a su receptor (ETR1), da como resultado un control negativo sobre la actividad de esta proteína (Bleecker y Schaller, 1996). La mutación *etr1-1*, dominante e insensible al etileno, resulta en la activación constitutiva de la actividad de la proteína ETR1, es decir que la proteína actúa como si no hubiese etileno. Por el contrario, la

doble pérdida de función en los mutantes (*ers1-2, etr1-6; ers1-2, etr1-7*) muestra una fuerte respuesta constitutiva semejante al fenotipo de las plantas crecidas en etileno abundante, que es coherente con el modelo de regulador negativo en la función del receptor (Wang *et al.*, 2003).

En segundo lugar, si la unión de etileno ejerce un control negativo sobre la actividad de ETR1, otros factores pueden tener funciones similares. Los receptores del etileno tienen un dominio GAF involucrado en la detección de energía (Aravind y Ponting, 1997) y relacionado con el dominio PAS, otro señalizador y transductor sensorial (Ho *et al.*, 2000). La unión del oxígeno a la proteína FIXL en *Sinorhizobium meliloti* da como resultado la regulación negativa de la actividad quinasa (Silva Sousa *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la actividad de ETR1 está regulada por el peróxido de hidrógeno en las células estomáticas (Desikan *et al.*, 2005). Por tanto, el receptor ETR1 es un sensor global cuya actividad puede estar regulada por el balance redox o por el estado general de energía de la célula, el cual afecta a los aspectos globales de desarrollo tales como la forma de las semillas.

La descripción morfológica de las estructuras de las plantas es un requisito indispensable para la comprensión de las relaciones entre estructura y función en los organismos, y puede contribuir a identificar mecanismos de desarrollo asociados con la composición y la actividad genómica. La comparación de la forma de la semilla de *Arabidopsis* con una curva cardioide alargada en el eje X puede ayudarnos a entender y cuantificar la variación morfológica de las semillas, los cambios en el curso de la imbibición y las alteraciones en los mutantes, así como las diferencias entre los genotipos relacionados.

Los genotipos insensibles al etileno *etr1-1* y *ein2-1* tienen valores de curvatura en su ápice radicular más bajos que el tipo silvestre (Cervantes y Tocino, 2005; Noriega *et al.*, 2008), detectándose alteraciones en la polaridad de las semillas en el transcurso de la imbibición de estos y otros genotipos mutantes de etileno (Robert *et al.*, 2008). Los valores del índice G fueron menores en los mutantes *etr1-1* tanto en semilla seca como después de la imbibición (Cervantes *et al.*, 2010). Pero, como se mencionaba anteriormente, el índice G no es la mejor medida de la bondad del ajuste (página 82).

Las semillas de *etr1-1* son las que menos aumentan su área durante la imbibición. Las semillas secas tienen la relación largo/ancho más baja que el resto de los genotipos y después de la imbibición la más alta (esto implica en semillas embebidas un índice de circularidad más bajo). Las semillas del mutante *etr1-1* cambian menos en el curso de la imbibición y presentan valores menores del índice G. Para el índice J no se encontraron diferencias entre los distintos genotipos, sin embargo el número de semillas utilizado en este estudio fue considerablemente inferior al utilizado para el estudio del índice G (de 10 a 20 semillas para el índice J y 125 para el índice G). El análisis del índice J en un mayor número de semillas sería útil para aclarar estos resultados.



Las semillas del triple mutante son las que tienen un área mayor tanto cuando están secas como cuando han tomado agua y su relación largo/ancho es mayor en semillas embebidas que en Columbia, *ctr1-1* y *eto1-1*.

El modelo de regresión curvilínea presentado en el apartado cuarto da una visión más completa y puede ayudar a resolver las disyuntivas que se refieren a cada uno de estos mutantes.

La comparación de la forma de la semilla de *Arabidopsis* con una cardioide alargada puede aportar una mayor comprensión y proporciona la manera de cuantificar la variación morfológica de las semillas, los cambios en el curso de la imbibición, las alteraciones en los mutantes, así como las diferencias entre los genotipos relacionados. Su aplicación en el análisis de la forma en mutantes de etileno mostró diferencias en la forma general de mutantes *etr1-1* insensibles al etileno.

### 3.3. Mutantes en la ruta del etileno en leguminosas-modelo

Las comparaciones entre los genotipos mutantes demuestran diferencias en la forma de las semillas y en su tamaño (tabla 64).

	Tamaño (Área)		Forma (Índice J)	
	Secas	Embebidas	Secas	Embebidas
Gifu vs MG-20	+	+	-	+
<i>LjEtr1-1</i> vs Gifu	+	-	-	+
<i>Ljhar1-1</i> vs Gifu	+	+	-	-
<i>enigma-1</i> vs MG-20	+	+	+	+

Tabla 64.- Diferencias en el tamaño y la forma de las semillas entre las variedades de *L. japonicus* Gifu y MG-20, o entre los mutantes y los genotipos parentales respectivos. MG-20 es el parental para *enigma-1*; GIFU para *Ljetr1-1* y *Ljhar1-1*. (+) representa diferencias: (-), no hay diferencias.

Se han encontrado papeles antagonistas para el ABA y el etileno en las semillas. En *Arabidopsis*, mutantes insensibles al etileno (*ein2*) tienen mayor sensibilidad al ABA (Beaudoin *et al*, 2000; Ghassemian *et al*, 2000). Las semillas del mutante *enigma-1* son menores y tienen mayor sensibilidad a ABA (Chan *et al.*, 2013). También los mutantes *beyma*, insensibles al ABA tienen un menor tamaño de las semillas (tabla 48). Las semillas del mutante *enigma-1* presentan además diferencias en la forma, sus valores de índice J son menores que los del

genotipo parental (MG-20) tanto en las semillas secas como después de la imbibición (tablas 45 y 47, figura 49, páginas 116 a 120).

El ABA es conocido por promover la quiescencia y suprimir la diferenciación en el meristemo de la raíz primaria de *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2010). Así, en *L. japonicus*, las semillas de tamaño reducido pueden ser el resultado de una división celular limitada como consecuencia de la mayor sensibilidad al ABA. Además, la reducción de tamaño tiene como resultado un aumento de la relación superficie/volumen que puede dar lugar a una mayor penetración de ABA en las células. Veíamos arriba que los mutantes insensibles a etileno de *Arabidopsis* (*etr1-1*) tenían valores más bajos en el índice G que en el tipo silvestre (Cervantes *et al.*, 2010). En *Lotus* y *Medicago* los genotipos mutados en la vía de detección de etileno presentan un rango complejo de alteraciones en el tamaño y forma de la semilla.

En *L. japonicus*, se encuentran diferencias de tamaño tanto en las semillas secas como después de la imbibición. Además de las diferencias entre las variedades ya comentadas (MG-20 tiene semillas más grandes que Gifu; página 148), en general, las semillas de las variedades de tipo silvestre son mayores que sus correspondientes mutantes, resultando en una amplia gama de tamaños. El tamaño reducido de semillas en los mutantes puede estar asociado con una actividad meristemática alterada, siendo éste un efecto directo de la mutación en *Ljhar1-1* (Nishimura *et al.*, 2002; Krusell *et al.*, 2002), o una consecuencia de la sensibilidad hormonal alterada (al ABA y al etileno en los mutantes insensibles al etileno).

También se encontraron diferencias en la forma. Las semillas secas de la variedad MG-20 presentan un mejor ajuste a una curva cardioide que las semillas de mutante *enigma-1* (el índice J era menor en *enigma-1*). El efecto se mantuvo en semillas embebidas. Del mismo modo, en las semillas embebidas, el índice J también fue menor en los mutantes *Ljetr1-1* que en el tipo silvestre, Gifu. Así, mientras que en *enigma-1*, el tamaño reducido de las semillas se asoció con la forma alterada tanto en las semillas secas como embebidas (tabla 45 y 47; figura 49), en *Ljetr1-1* ambos efectos se vieron conjuntamente sólo en semillas embebidas (las semillas secas de *Ljetr1-1* eran más pequeñas que Gifu, pero no se observaron diferencias en la forma). Por último, las semillas de *Ljhar1-1*, aunque de pequeño tamaño, no presentaron diferencias en la forma con su genotipo parental (Gifu). Por lo tanto, los resultados permiten discriminar entre los cambios en tamaño y forma durante la germinación de semillas, y mostrar diferentes efectos en los mutantes de ambos genotipos. El efecto en mutantes *enigma-1* va más allá del tamaño de la semilla y consiste en alteraciones de la forma que son notables ya en las semillas secas.

Los mutantes en el gen EIN2 presentan cambios en tamaño y forma, tanto en las semillas secas como embebidas en *Lotus*, pero sólo en el tamaño y en el índice de circularidad (no en el índice J), en las semillas secas de *Medicago*. Los mutantes en este gen también tienen diferentes efectos en la nodulación. El mutante *sickle* de *Medicago* tiene un número mayor de nódulos por planta, mientras que el mutante *enigma-1* de *Lotus* presenta un número

menor de nódulos (en función del alelo). Estas diferencias de nodulación se pueden explicar por la presencia de una segunda copia del gen EIN2 (LjEIN2b; Desbrosses y Stougaard, 2011) en el cromosoma 5 de *Lotus*, lo que sugiere una vía de diversificación después de la duplicación del gen. Nuestros resultados añaden nuevos datos a los fenotipos de nodulación que indican divergencias entre las dos especies modelo.

Los resultados actuales nos permiten distinguir dos procesos independientes durante la germinación de la semilla: el crecimiento y el desarrollo de la forma (Tabla 64). La mutación en el gen EIN2a en *Lotus japonicus* (*enigma-1*) tiene efectos sobre el tamaño de la semilla y su forma. El hecho de que otras mutaciones (*Ljhar1-1*) sólo tengan efectos en el tamaño de la semilla, pero no en la forma, indica que ambos procesos se encuentran sometidos a mecanismos de regulación diferentes. Por ejemplo, el tamaño de la semilla puede ser el resultado del tamaño de las células, el llenado de las semillas, y la actividad de la división celular, procesos que están bajo el control de distintas rutas metabólicas, mientras que la forma de semillas podría estar sometida a la regulación sistémica, y cambiar con aspectos puntuales del crecimiento de la célula, tales como la regulación de la polaridad. La aproximación independiente a estos procesos representa un sistema interesante para el análisis de la acción hormonal en la morfología de las plantas.

#### 4. Aplicaciones del método basado en la curva cardiode en sistemas modelo: II. Obtención de ecuaciones que representan cambios en la forma durante la germinación de semillas de *Arabidopsis*.

Se ha utilizado el índice J como medida de la forma. Las semillas con valores elevados del índice J tienen una forma más parecida a la curva cardiode. Esto nos permite una aproximación al cambio de la forma en la semilla durante las fases iniciales de la germinación (imbibición de la semilla). Para efectuar este estudio del cambio en la forma durante la imbibición se midieron cuatro magnitudes en las semillas a lo largo de este proceso: Área, relación largo ancho, índice de circularidad e índice J. Se utilizaron semillas de las variedades Columbia (Col) y Wassilewskija, y de sus respectivos mutantes en la ruta de síntesis de celulosa *e-112* y *kor1-1* (siete semillas por genotipo, midiéndose cada semilla en veinte momentos comprendidos entre la semilla seca, 0 horas, y treinta horas de imbibición)

Se buscaron las ecuaciones que mejor se ajustaban con las curvas descritas por los valores medidos obteniéndose los mejores ajustes ( $r^2 > 0,9$ ) con ecuaciones del tipo logarítmico  $y = b_0 + b_1 * \log(x)$ . En cuanto al área se encontró que los cuatro genotipos respondían al mismo ajuste  $r^2 = 0,983$  (figura 44;  $y = 0,241 + 0,09 * \log(t)$ ). En relación con las otras magnitudes (relación largo ancho, índice de circularidad e índice J) se encontró para todas ellas que, si bien en general los ajustes mediante ecuaciones logarítmicas eran adecuados, se obtenían ecuaciones diferentes para las curvas procedentes de los tipos silvestres y aquellas que se obtenían con los valores obtenidos para las semillas de los genotipos mutantes.

Tanto la relación largo ancho como el índice de circularidad son aproximaciones a la forma. Ambas nos dan una idea general imprecisa de la forma de la semilla y sus valores suelen estar relacionados, es decir semillas (u objetos en general) que tengan un índice de circularidad elevado (próximo a la unidad), tendrán una relación largo ancho también próxima a la unidad. Mientras que los valores del índice de circularidad tienen un máximo igual a la unidad, los valores máximos y mínimos de la relación largo ancho son ilimitados. En ambos casos se ajustaron curvas logarítmicas con distintos parámetros para los tipos silvestres y para los mutantes. A pesar de que los parámetros eran diferentes en la ecuación ajustada para los genotipos silvestres y la ajustada para los mutantes, la forma de las curvas es parecida. En el caso de la relación largo ancho el parámetro  $b_1$  fue negativo y la gráfica es decreciente, con valores máximos en las semillas secas, para todos los genotipos. Para el índice de circularidad, el valor de  $b_1$  es positivo y la gráfica es creciente, es decir que, tanto en los genotipos silvestres Columbia y Wassilewskija como en los mutantes, es mínimo en las semillas secas y crece en el curso de la imbibición.

El índice J nos da una aproximación más rigurosa al análisis de la forma. Para esta magnitud encontramos que el ajuste con una ecuación logarítmica no fue adecuado en los

genotipos silvestres Columbia y Wassilewskija, pero sí en los mutantes (tablas 40 y 41). La comparación de las curvas obtenidas para los genotipos silvestres y para los mutantes permite una interpretación de los cambios en la forma durante la imbibición (figura 47).

Las semillas de los genotipos silvestres parten en la semilla seca de valores inferiores al máximo, con lo cual su forma, en el curso de la imbibición, adquiere mayor parecido con la curva cardioide en un momento preciso que hemos encontrado en torno a los noventa minutos (figuras 47 y 60, páginas 111 y 145). El índice J disminuye a partir de ahí. En el caso de los mutantes, los valores máximos del índice J se encuentran en la semilla seca y disminuyen (su forma se aleja del modelo) en el curso de la imbibición.

Las curvas ajustadas con distintas. En el caso de los genotipos mutantes se obtuvo un ajuste adecuado con una ecuación logarítmica ( $r^2 = 0.337$ ) pero no así en los tipos silvestres ( $r^2 = 0.872$ ). La comparación entre las tendencias de los valores en ambos grupos (silvestres y mutantes) muestra que mientras que en los tipos silvestres se obtienen valores máximos en el curso de la imbibición, las semillas de los mutantes en la ruta de biosíntesis de celulosa adquieren el mayor parecido con la cardioide en el curso de la embriogénesis y son incapaces de progresar en el curso de la imbibición.

Ambos mutantes *e-112* y *kor1-1* tienen deficiencias en la síntesis de celulosa. Los mutantes *e-112* en el locus PROCUSTE1 (PCR1) presentan defectos en la elongación celular específicamente en raíces y en el crecimiento de los hipocotilos en oscuridad. En ellos, la deficiencia de celulosa ocasiona huecos en la pared celular (Desnos *et al.*, 1996; Fagard *et al.*, 2000). El mutante *kor1-1* tiene alteraciones en la elongación celular. En el mutante *kor1-2* (no estudiado en este trabajo) la deficiencia en celulosa es mayor que en *kor1-1* y en él se han descrito cambios en la forma de las semillas con respecto al tipo silvestre (Zuo *et al.*, 2000; figura 62). En la imagen se aprecian diferencias entre los embriones del tipo silvestre y del mutante *kor1-2*. Los embriones de *kor1-2* presentan una forma distorsionada en sus cotiledones y su radícula, más redondeados y en un estado de diferenciación incompleta. El embrión ocupa la mayor parte de la semilla y adquiere una forma esférica en comparación con el tipo silvestre. A partir de esa forma resulta más difícil la progresión normal en el curso de la imbibición. En *kor1-1*, y en *e-112* los valores del índice de circularidad son superiores a los de los tipos silvestres (figura 45). Los valores de la relación largo ancho, son, por el contrario, menores en los genotipos mutantes (figura 46). Estos resultados están de acuerdo con una diferenciación deficiente en las semillas. Por otra parte los valores del índice J son menores que en los tipos silvestres. Los valores máximos del índice J en los mutantes se tienen en semillas secas, y disminuyen en el curso de la imbibición. Por el contrario en los tipos silvestres aumentan en el curso de los primeros noventa minutos de la imbibición, indicando que la imbibición no es un proceso pasivo de toma de agua. En el curso de la imbibición, el embrión termina los procesos de diferenciación celular y adquiere su forma.

El método descrito mediante el ajuste de ecuaciones revela que el cambio en la forma a lo largo de la imbibición es una característica útil a la hora de describir los efectos de mutaciones o alteraciones en el crecimiento debidas a efectos ambientales. Será interesante abordar este tipo de estudio basado en el ajuste de ecuaciones para los cambios de la forma en los mutantes de etileno con los cuales los resultados eran menos concluyentes. Experimentos similares se pueden llevar a cabo en *Lotus* y *Medicago*.

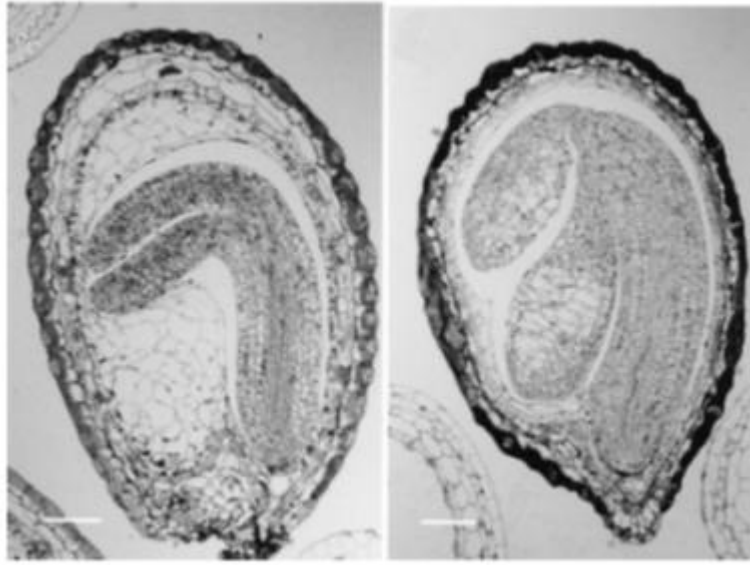


Figura 62.- Secciones al microscopio óptico de semillas del tipo silvestre (izquierda) y *kor1-2* (derecha). Corresponden a embriones de la semilla seca.

## 5. Aplicaciones del método basado en la curva cardiode al análisis morfológico en semillas de dos variedades de *Capparis spinosa*.

En relación con el tamaño de la semilla nuestros resultados confirman y amplían los de Saadaoui *et al* (2011) quienes encontraron diferencias entre subespecies de *Capparis spinosa*. *C. spinosa* subsp. *Spinosa*, limitada al norte y *C. spinosa* subsp. *Rupestris*, que se encuentra en todo el territorio de Túnez, incluyendo los desiertos del sur. Las semillas de *Rupestris* son más pequeñas que las de *Spinosa* (tabla 53, figura 54) En el estudio de poblaciones sicilianas de *C. spinosa*, Fici (2001) indica que la subespecie *Rupestris* representa un tipo primitivo, mientras que la subespecie *Spinosa* es una forma derivada de esta. En apoyo de la hipótesis de Fici, *Rupestris* tiene varias características de una planta del tipo r (Begon *et al*, 2006): Su estructura es más simple (rastrera y sin espinas), tiene mayor número de estambres y se reproduce mediante auto-fecundación; además sus semillas son menores. La subespecie *Spinosa* puede ser el resultado de una divergencia a partir de plantas del tipo r hacia adaptaciones más especializadas: La estructura de la planta es más compleja (erecta y espinosa), presenta una reducción del número de estambres y reproducción cruzada; además, las semillas son mayores (Saadaoui, 2012).

En este trabajo se ha utilizado el modelo geométrico basado en la similitud con una curva cardiode para la descripción de las semillas de *Capparis spinosa* recolectadas en diez lugares diferentes a lo largo de Túnez (figura 29). El índice J nos da el porcentaje de similitud entre las imágenes de las semillas con la curva cardiode y es superior a noventa y cinco (> 95) en 28 semillas de un total de 100 analizadas. El ajuste de las semillas de *C. spinosa* a una curva cardiode puede, por lo tanto, ser una herramienta útil para analizar y clasificar las semillas de distinta procedencia. Se definieron varios tipos morfológicos entre las semillas (ver página 127). El tipo A corresponde a las semillas cuyo índice J es superior a 95. En un total de diez semillas analizadas, la población de Chemtou es la única que no contiene semillas de tipo A. Esta población es también la única en la que coexisten las dos subespecies (*Spinosa* y *Rupestris*), encontrándose también una presencia frecuente de híbridos (Saadaoui, 2012). Posteriores estudios permitirán comprobar estos resultados y verificar si puede existir una relación entre los valores bajos de índice J y la coexistencia de ambas subespecies.

El análisis de la forma de las semillas mediante su división en cuatro cuadrantes (Q1 a Q4) permite identificar la parte derecha de la semilla (Q1 y Q4) como la zona de máxima variación en contraste con la izquierda (Q2 y Q3). El análisis independiente de los cuatro cuadrantes permite la identificación de cuatro tipos adicionales de semillas: B, C, D y E, según sus porcentajes de identidad con la curva cardiode en cada cuadrante.

El análisis de Q1 reveló diferencias entre las subespecies. La media de los valores de Q1 es superior en *Rupestris*. El número total de semillas de tipo B en *Rupestris* es de 26; en *Espinosa*, 44.

Los tipos A, B, C, D y E constituyen cinco morfotipos básicos no excluyentes y así una semilla puede pertenecer a cualquier combinación de un total de  $2^5 = 32$  combinaciones teóricas posibles. De las 32 posibles combinaciones sólo se han encontrado 14 y, de estas, 6 son exclusivas de *Rupestris* y una de *Spinosa* (ver figura 53, página 127). Esto nos muestra en primer lugar una gran diversidad para la forma de las semillas en estas subespecies, diversidad que se ha puesto de manifiesto sólo mediante el análisis geométrico y que es superior en la variedad *Rupestris*. De interés particular es el tipo llamado cero (0) (no A, no B, no C, no D, no E). Este morfotipo no lo vemos en la subsp. *Spinosa* y, sin embargo, en *Rupestris* hay un total de ocho semillas (del total de cincuenta: tres en Chenini Tataouine, una en Houmana, cuatro en Ghar el Melh).

Los tres resultados principales de este trabajo son: primero, la existencia de una mayor diversidad morfológica en *Rupestris*; segundo, la abundancia del morfotipo 0 en *Rupestris*, y tercero, la mayor presencia de semillas de tipo B en *Spinosa*. El primero y el segundo están de acuerdo con la hipótesis de Fici (2001) que propone un estado primitivo en las semillas de *Rupestris* asociado a la no-especialización que caracteriza al tipo r.

Por lo tanto, nuestros resultados muestran una morfología diferente entre subespecies y apoyan la hipótesis de que *C. spinosa* subsp. *Rupestris* tiene características de tipo r, porque las plantas modelo (*Arabidopsis* y los modelos de leguminosas *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*) son ejemplos del tipo r y sus semillas tienen notable similitud con el modelo cardioide.

Entre las distintas poblaciones se encuentran también diferencias en Q1. Así Chemtou tiene valores más pequeños que la mayoría de las otras poblaciones. Las diferencias en Q3 también se pueden atribuir a la población o a una combinación de las subespecies y la localización geográfica, ya que se encontraron diferencias entre Ghomrassen (*Rupestris*, en el sur) y Chouiqui (*Spinosa*, norte). Tales análisis de la variación en poblaciones requieren un mayor número de semillas. La variación en Q2 y Q4 no parece ser atribuible a las subespecies, ni a las poblaciones, y puede estar asociada con aspectos de desarrollo relacionados con el crecimiento en las vainas, las condiciones ambientales o de la cosecha y almacenamiento de la semilla, aunque puede ser que un análisis más detallado revele diferencias entre poblaciones.

Las dos poblaciones del sur, Ghomrassen y Chenini Tataouine se encuentran geográficamente aisladas de las otras ocho poblaciones por la presencia del gran lago salado de Chott Jerid. Estas dos poblaciones tienen características específicas como la presencia de pelos y un gran número de estambres (Saadaoui et al., 2011). Sin embargo, no muestran una forma característica de la semilla. Este resultado se une al de Ghorbel *et al.* (2001), quienes mostraron la importancia del efecto genético en comparación con el efecto geográfico sobre el



polimorfismo de *C. spinosa* en Túnez, estos autores utilizaron el análisis molecular por RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*; amplificación aleatoria de DNA polimórfico).



## CONCLUSIONES

---



1. Las imágenes de semillas de las plantas modelo *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* se ajustan a la forma de la curva cardioide.
2. El índice J proporciona el método adecuado para medir la forma según este modelo y compararla entre variedades, mutantes o entre distintas fases del desarrollo o en respuesta a cambios ambientales.
3. Los cambios en los valores del índice J a lo largo de la imbibición de semillas de *Arabidopsis* se representan mediante ecuaciones logarítmicas permitiendo estudiar el efecto de mutaciones puntuales sobre la forma.
4. En *Arabidopsis thaliana* y en *Lotus japonicus* mutantes insensibles al etileno presentan alteraciones en la forma de sus semillas.
5. Los mutantes en la biosíntesis de celulosa en *Arabidopsis* tienen alteraciones en la forma de sus semillas. A diferencia de los tipos silvestres, los valores máximos del índice J se encuentran en sus semillas secas y disminuyen en el curso de la imbibición. En el tipo silvestre se obtienen valores máximos en el curso de la imbibición.
6. El estudio de la forma aporta información sobre la diversidad. En *Capparis spinosa* la subespecie *Rupestris* presenta mayor diversidad en la forma de sus semillas que la subespecie *Spinosa*.



## BIBLIOGRAFÍA

---





- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Mikal E. Saltveit, J., 1992. Ethylene in Plant Biology. Elsevier Science.
- Alvarez-Buylla, E.R., Benitez, M., Davila, E.B., Chaos, A., Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P., 2007. Gene regulatory network models for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 83-91.
- Aravind, L., Ponting, C.P., 1997. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem.Sci.* 22, 458-459.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Tabata, S., 2004. Characteristics of the *Lotus japonicus* gene repertoire deduced from large-scale expressed sequence tag (EST) analysis. *Plant Mol.Biol.* 54, 405-414.
- Augspurger, C.K., 1988. Mass allocation, moisture-content, and dispersal capacity of wind-dispersed tropical diaspores. *New Phytol.* 108, 357-368.
- Baluska, F., Brailsford, R.W., Hauskrecht, M., Jackson, M.B., Barlow, P.W., 1993. Cellular dimorphism in the maize root cortex-involvement of microtubules, ethylene and gibberellin in the differentiation of cellular behavior in postmitotic growth zones. *Bot. Acta* 106, 394-403.
- Barbera, G., 1991. Programme de recherche Agrimed: le câprier (*Capparis* spp.). C.C.E. Rapport EUR 13617 FR.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2001. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2007. A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Sci. Res.* 17, 11-20.
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L., 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems*. 4th edition. Blackwell Publishing.
- Bell, C.J., Dixon, R.A., Farmer, A.D., Flores, R., Inman, J., Gonzales, R.A., Harrison, M.J., Paiva, N.L., Scott, A.D., Weller, J.W., May, G.D., 2001. The *Medicago* Genome Initiative: a model legume database. *Nucleic Acids Res.* 29, 114-117.
- BIPM, Bureau International des Poids et Mesures.
- Biswas, B., Chan, P.K., Gresshoff, P.M., 2009. A Novel ABA Insensitive Mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Mol. Plant.* 2, 487-499.
- Bleecker, A.B., Estelle, M.A., Somerville, C., Kende, H., 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis-thaliana*. *Science* 241, 1086-1089.

- Bleecker, A.B., Schaller, G.E., 1996. The mechanism of ethylene perception. *Plant Physiol.* 111, 653-660.
- Bonnet, C., Wandelaar, J., 1754. Recherches sur l'usage des feuilles dans les plantes, et sur quelques autres sujets relatifs a l'histoire de la vegetation. Elie Luzac, fils. imp. lib. Paris.
- Bonnier, M., 1890. Cultures expérimentales dans les Alpes et les Pyrénées. *Revue générale de botanique*, 513-546.
- Cervantes, E., 1998. Oxygen sensing in plants. In: Lopez-Barneo J, W.K. (Ed.), *Oxygen regulation of ion channels and gene expression*. Futura Publishing Co. Inc, New York, pp. 57-66.
- Cervantes, E., 2008. Challenging *Arabidopsis thaliana* as the Ultimate Model Species: Can Seed Germination be the Achilles' Heel? *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2, 106-109.
- Cervantes, E., Martin, J.J., Ardanuy, R., de Diego, J.G., Tocino, A., 2010. Modeling the *Arabidopsis* seed shape by a cardioid: Efficacy of the adjustment with a scale change with factor equal to the *Golden Ratio* and analysis of seed shape in ethylene mutants. *J. Plant Physiol.* 167, 408-410.
- Cervantes, E., Martin, J.J., Chan, P.K., Gresshoff, P.M., Tocino, A., 2012. Seed shape in model legumes: Approximation by a cardioid reveals differences in ethylene insensitive mutants of *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *J. Plant Physiol.* 169, 1359-1365.
- Cervantes, E., Tocino, A., 2005. Geometric analysis of *Arabidopsis* root apex reveals a new aspect of the ethylene signal transduction pathway in development. *J. Plant Physiol.* 162, 1038-1045.
- Cervantes, E., Tocino, A., 2009. Ethylene, free radicals and the transition between stable states in plant morphology. *Plant signaling & behavior* 4, 367-371.
- Claßen-Bockhoff, R., 2001. Plant morphology: The historic concepts of Wilhelm Troll, Walter Zimmermann and Agnes Arber. *Ann. Bot.* 88, 1153-1172.
- Collinson, M.E., 1983. *Fossil Plants of the London Clay*. The palaeontological association. London.
- Corner, E.J.H., 1976. *The Seeds of Dicotyledons*. Cambridge University Press.
- Chan, P.K., Biswas, B., Gresshoff, P.M., 2013. Classical Ethylene Insensitive Mutants of the *Arabidopsis* EIN2 Orthologue Lack the Expected 'hypernodulation' Response in *Lotus japonicus*. *Journal of Integrative Plant Biology*.
- D'Arcy Thompson, W., 2003. *Sobre el crecimiento y la forma*. Cambridge University Press.

- Depéret, C., 1929. Les Transformations du Monde Animal. Flammarion, Paris.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Bright, J., Harrison, J., Weir, L., Hooley, R., Neill, S.J., 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 137, 831-834.
- Desnos, T., Orbovic, V., Bellini, C., Kronenberger, J., Caboche, M., Traas, J., Hofte, H., 1996. Procuste1 mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark and light-grown *Arabidopsis* seedlings. *Development* 122, 683-693.
- Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refregier, G., Desnos, T., Aletti, E., Py, N., Pelletier, S., Hofte, H., 2002. Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant Physiol.* 128, 482-490.
- Duhem, P., 1978. La Teoria Fisica. Il Mulino, Bologna, Italy.
- Fagard, M., Desnos, T., Desprez, T., Goubet, F., Refregier, G., Mouille, G., McCann, M., Rayon, C., Vernhettes, S., Hofte, H., 2000. PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 2409-2423.
- Fenner, M., 1992. Environmental influences on seed size and composition. *Horticultural Reviews*, 183-213.
- Fenner, M., Thompson, K., 2005. The Ecology of Seeds. Cambridge University Press.
- Fici, S., 2001. Intraspecific variation and evolutionary trends in *Capparis spinosa* L. (*Capparaceae*). *Plant Syst. Evol.* 228, 123-141.
- Fici, S., Gianguzzi, L., 1997. Diversity and conservation in wild and cultivated *Capparis* in Sicily. *Bocconea* 7, 437-443.
- Fiz, O., Vargas, P., Alarcon, M., Aedo, C., Garcia, J.L., Aldasoro, J.J., 2008. Phylogeny and historical biogeography of *Geraniaceae* in relation to climate changes and pollination ecology. *Syst. Bot.* 33, 326-342.
- Flores-Vindas, E.M., 1999. La planta: Estructura y función. Libro Universitario Regional (EULA/GTZ).
- Foucault, M., 1982. Las palabras y las cosas: una arqueología de las ciencias humanas. Siglo Veintiuno.
- Goethe, J.W.V., 1790. Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären. Carl Wilhelm Ettinger, Gotha

- Goff, S.A., 1999. Rice as a model for cereal genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 86-89.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R.L., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchinson, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J.P., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S.P., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L.L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y.S., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A., Briggs, S., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp japonica). *Science* 296, 92-100.
- Grau, J.F.P., 2003. Técnicas de análisis de imagen: Aplicaciones en Biología. Publicacions de la Universitat de València.
- Grillo, O., Mattana, E., Venora, G., Bacchetta, G., 2010. Statistical seed classifiers of 10 plant families representative of the Mediterranean vascular flora. *Seed Sci. Technol.* 38, 455-476.
- Guzman, P., Ecker, J.R., 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2, 513-523.
- Hauser, M.T., Aufsatz, W., Jonak, C., Luschig, C., 2011. Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* 1809, 459-468.
- Hall, A.E., Bleecker, A.B., 2003. Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the *Arabidopsis* ethylene receptors reveals that the *ers1 etr1* double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent. *Plant Cell* 15, 2032-2041.
- Herridge, R.P., Day, R.C., Baldwin, S., Macknight, R.C., 2011. Rapid analysis of seed size in *Arabidopsis* for mutant and QTL discovery. *Plant Methods* 7.
- Heywood, V.H., 1985. Las Plantas con Flores. Reverte, Editorial S.A.
- Heywood, V.H., 1993. *Capparis* L. In: (Eds). *Flora Europaea*. Cambridge University Press. Cambridge. 1, n.e. (Ed.), *Flora Europaea*.
- Higton, R.N., Akeroyd, J.R., 1991. Variation in *Capparis spinosa* L. in Europe. *Bot. J. Linnean Soc.* 106, 104-112.
- Ho, Y.S.J., Burden, L.M., Hurley, J.H., 2000. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *Embo J.* 19, 5288-5299.
- Hofmeister, W., 1868. Allgemeine Morphologie der Gewächse. Wilhelm Engelmann.

- Hua, J., Meyerowitz, E.M., 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94, 261-271.
- Izco, J., 1997. Botánica. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Jacobs, M., 1965. The Genus *Capparis* (*Capparaceae*): From the Indus to the Pacific. Blumea.
- Kaplan, D.R., 2001. The science of plant morphology: Definition, history, and role in modern biology. *Am. J. Bot.* 88, 1711-1741.
- Kaplan, D.R., Groff, P.A., 1995. Developmental themes in vascular plants: Functional and evolutionary significance. In: Hoch, P.C., Stephenson, A.G. (Eds.), *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*, pp. 111-145.
- Keefe, R.F., Davis, A.S., 2010. Modeling individual conifer seed shape as a sum of fused partial ellipsoids. *Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For.* 40, 2175-2186.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., Ecker, J.R., 1993. *ctr1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein-kinases. *Cell* 72, 427-441.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N., Stougaard, J., 2002. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420, 422-426.
- Lamarck., 1805. *Histoire naturelle des végétaux: classés par familles, avec la citation de la classe et de l'ordre de Linné, et l'indication de l'usage que l'on peut faire des plantes dans les arts, le commerce, l'agriculture, le jardinage, la médecine, etc. des figures dessinées d'après nature, et un genera complet, selon le système de Linné, avec des renvois aux familles naturelles de A.L. de Jussieu.* Chez Deterville. Paris.
- Leubner-Metzger, G., 2005. The Seed Biology Place. <http://www.seedbiology.de>.
- Leython, S., Jáuregui, D., 2008. Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de *Calliandra* (*Leguminosae-Mimosoideae*) de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 1075-1086. .
- Li, X.J., Baskin, J.M., Baskin, C.C., 1999. Comparative morphology and physiology of fruit and seed development in the two shrubs *Rhus aromatica* and *R-glabra* (*Anacardiaceae*). *Am. J. Bot.* 86, 1217-1225.
- Linneo, C., 1758. *Systema naturae, per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis locis.* Salvias, Stockholm (Sweden).

- Livio, M., 2011. La proporción áurea: La historia de Phi, el número más sorprendente del mundo. Grupo Planeta.
- Lohar, D., Stiller, J., Kam, J., Stacey, G., Gresshoff, P.M., 2009. Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 104, 277-285.
- MacArthur, R.H., Wilson, E.O., 1967. The theory of island biogeography. Princeton University Press.
- Marquez, A.J., Orea, A., Pajuelo, P., Pajuelo, E., Romero, J.M., Arcondeguy, T., Betti, M., Garcia-Calderon, M., Estivill, G., Pal'ove-Balang, P., 2004. Nitrogen assimilation in roots of the model legume *Lotus japonicus*. *Biologia* 59, 69-76.
- Martin, A.C., 1946. The comparative internal morphology of seeds. *American Midland Naturalist* 36, 513-660.
- Moles, A.T., Ackerly, D.D., Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Smith, R., Leishman, M.R., Mayfield, M.M., Pitman, A., Wood, J.T., Westoby, M., 2007. Global patterns in seed size. *Global Ecology and Biogeography* 16, 109-116.
- Moles, A.T., Westoby, M., 2003. Latitude, seed predation and seed mass. *Journal of Biogeography* 30, 105-128.
- Multinacional *Arabidopsis* Steering Committee, 2002. *Arabidopsis*: The Model Plant. The Multinational Coordinated *Arabidopsis thaliana* Functional Genomics Project, The National Science Foundation. Virginia
- Muñoz, B.C., Herrera Peraza, R.A., Sánchez, J.A., Montejo, L., 2001. Características morfológicas y fisiológicas de semillas de *Prunus occidentalis*: comparación entre especies de diferentes estrategias sucesionales. *Ecotrópicos* 14, 10.
- Murray, B.R., Brown, A.H.D., Grace, J.P., 2003. Geographic gradients in seed size among and within perennial Australian Glycine species. *Aust. J. Bot.* 51, 47-56.
- Murray, J.D., 2002. *Mathematical Biology I: An Introduction* (3rd Edn). Springer, New York.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., Hofte, H., 1998. A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 17, 5563-5576.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., Kawaguchi, M., 2002. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420, 426-429.

- Noriega, A., Cervantes, E., Tocino, A., 2008. Ethylene responses in *Arabidopsis* seedlings include the reduction of curvature values in the root cap. *J. Plant Physiol.* 165, 960-966.
- Orio, G.A., 1874. Elementos de organografía, fisiología, metodología, clasificación y descripción de las familias naturales y nociones de geografía botánica. Imprenta de Segundo Martínez. Madrid.
- Penmetsa, R.V., Uribe, P., Anderson, J., Lichtenzveig, J., Gish, J.C., Nam, Y.W., Engstrom, E., Xu, K., Sckisel, G., Pereira, M., Baek, J.M., Lopez-Meyer, M., Long, S.R., Harrison, M.J., Singh, K.B., Kiss, G.B., Cook, D.R., 2008. The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant J.* 55, 580-595.
- Pianka, E.R., 1970. On r- and K-Selection. *The American Naturalist.* 104, 592-597
- Platon, 1872. Timeo. Colihue, Madrid.
- Researchgate, 2011. Research Gate.  
[https://www.researchgate.net/project/Description\\_of\\_seed\\_shape/](https://www.researchgate.net/project/Description_of_seed_shape/).
- Robert, C., Noriega, A., Tocino, A., Cervantes, E., 2008. Morphological analysis of seed shape in *Arabidopsis thaliana* reveals altered polarity in mutants of the ethylene signaling pathway. *J. Plant Physiol.* 165, 911-919.
- Rossi, P., 1986. I ragni e le formiche: un'apologia della storia della scienza. Il Mulino.
- Saadaoui, E., 2012. *Capparis spinosa* L. en Tunisie : Diversité et ecologie: Variabilité et richesse génétique. Presses Acad Miqués Francophones.
- Schwarz, H., 1980. Two-dimensional feature-shape indexes. *Mikroskopie* 37, 64-67.
- Silva Sousa, E.H., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.-A., 2007. A Memory of Oxygen Binding Explains the Dose Response of the Heme-Based Sensor FixL. *Biochemistry* 46, 6249-6257.
- Simpson, M.G., 2005. Plant Systematics. Elsevier Science.
- Smith, T.M., Smith, R.L., Román, E.S., 2007. Ecología. Addison-Wesley.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A.F.W., von Denffer, D., 1974. Tratado de Botánica. Marín.
- Szyjanowicz, P.M.J., McKinnon, I., Taylor, N.G., Gardiner, J., Jarvis, M.C., Turner, S.R., 2004. The irregular xylem 2 mutant is an allele of korrigan that affects the secondary cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 37, 730-740.

- Taiz, L., Zeiger, E., 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. Servei de Comunicació i Publicacions.
- Tanabata, T., Shibaya, T., Hori, K., Ebana, K., Yano, M., 2012. SmartGrain: High-Throughput Phenotyping Software for Measuring Seed Shape through Image Analysis. *Plant Physiol.* 160, 1871-1880.
- Thom, R., 1977. Stabilité structurelle et morphogénèse: essai d'une théorie générale des modèles. InterÉditions.
- Troll, W., Siegert, I., Siegert, A., 1937-1943. Vergleichende morphologie der höheren pflanzen. Otto Koeltz.
- Tutin, T., Burges, N., Chater, A., Edmondson, J., Heywood, V., Moore, D., Valentine, D., Walters, S., Webb, D., 1993. In: Press, C.U. (Ed.), *Flora Europaea*. Cambridge Univ. Press.
- Ulrike, M., Gallardo, K., Lesignor, C., Darmency, M., Burstin, J., Thompson, R., Rochat, C., Boutin, J.P., Kuester, H., Buitink, J., Leprince, O., Limami, A., Grusak, M.A., 1997. *Medicago* Hand book. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook>.
- Vila, C., 2010. Nature by Numbers - The theory behind this movie (La teoría tras la película). [www.eteraestudios.com](http://www.eteraestudios.com), Zaragoza (España).
- Wang, W., Hall, A.E., O'Malley, R., Bleecker, A.B., 2003. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 352-357.
- Willemse, M.T.M., Went, J.L., 1984. The female Gametophyte. In: Johri, B. (Ed.), *Embryology of Angiosperms*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 159-196.
- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F.B., Jiang, Q.Y., Gresshoff, P.M., de Bruijn, F.J., Stougaard, J., Szczyglowski, K., 2000. Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.* 23, 97-114.
- Wulff, R.D., 1986. Seed size variation in *Desmodium paniculatum* .1. Factors affecting seed size. *J. Ecol.* 74, 87-97.
- Zoric, L., Merkulov, L., Lukovic, J., Boza, P., 2010. Comparative seed morphology of *Trifolium* L. Species (*Fabaceae*). *Periodicum Biologorum* 112, 263-272.
- Zuo, J.R., Niu, Q.W., Nishizawa, N., Wu, Y., Kost, B., Chua, N.H., 2000. KORRIGAN, an *Arabidopsis* endo-1,4-beta-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell* 12, 1137-1152.



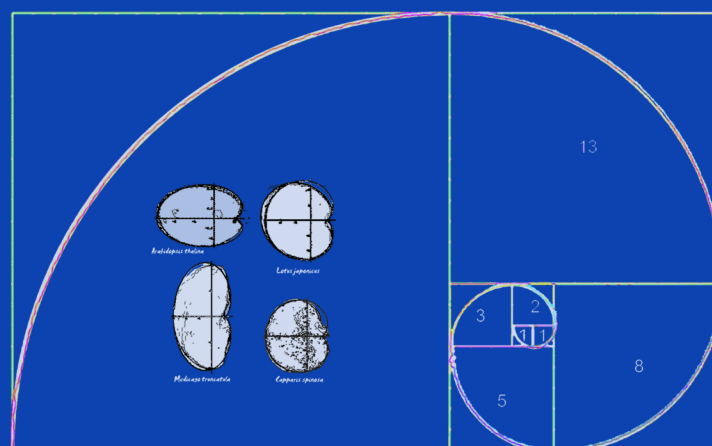
## PROCEDENCIA DE LAS IMÁGENES

---



Procedencia de las imágenes	Página
Figura 1.- Livio (2011).	10
Figura 2.- Adaptada de Wikipedia.	11
Figura 3.- Página web <i>Nature by numbers</i> • la teoría tras la película (Vila, 2010).	11
Figura 4.- Página web <i>Nature by numbers</i> • la teoría tras la película (Vila, 2010).	12
Figura 5.- Adaptada de Wikipedia.	13
Figura 6.- Adaptada de Wikipedia.	13
Figura 7.- Adaptada de Wikipedia.	15
Figura 9.- Grau (2003).	20
Figura 10.- Orio (1874).	28
Figura 11.- <a href="http://paisajimopueblosy jardines.blogspot.com.es">http://paisajimopueblosy jardines.blogspot.com.es</a>	29
Figura 12.- Claßen-Bockhoff (2001).	31
Figura 13.- Adaptada de Kaplan (2001).	32
Figura 15.- Adaptada de Heywood (1985).	47
Figura 16.- Izco (1997).	47
Figura 17.- Flores-Vindas (1999).	48
Figura 18.- Corner (1976).	49
Figura 19.- Compuesta a partir de Wikipedia.	50
Figura 20.- Martin (1946).	51
Figura 21.- Martin (1946).	53
Figura 22.- Martin (1946).	55
Figura 23.- Martin (1946).	56
Figura 24.-Collinson (1983).	57
Figura 25.- (b) <a href="http://www.nowpublic.com">www.nowpublic.com</a> (c) <a href="http://www.Anthropogen.com">www.Anthropogen.com</a> ).	58
Figura 27.- Adaptada de Google maps.	70
Figura 28.- Planta <a href="http://www.intersemillas.es">www.intersemillas.es</a> , flor <a href="http://www.toptropicals.com">www.toptropicals.com</a> , fruto <a href="http://eprints.utas.edu.au">eprints.utas.edu.au</a> y semilla.	72
Figura 29.- Google maps.	73
Figura 31.- Google maps.	75
Figura 58.- Adaptada de Wikipedia.	141
Figura 59.- Bonnier (1890).	143
Figura 61.- Cervantes (2010)	149
Figura 62.- Zuo <i>et. al.</i> (2000).	156





INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SALAMANCA  
(IRNASA)